

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Edgar H. RELYVELD

1^{re} THÈSE.

ÉTUDES SUR LA TOXINE
ET L'ANTITOXINE DIPHTÉRIQUES
ET LA RÉACTION TOXINE-ANTITOXINE

2^e THÈSE. *Propositions données par la Faculté*

Soutenues le 11 juin 1958 devant la Commission d'Examen

MM. WURMSER *Président*

TONNELAT {
LEDERER { *Examineurs*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Edgar H. RELYVELD

1^{re} THÈSE.

ÉTUDES SUR LA TOXINE
ET L'ANTITOXINE DIPHTÉRIQUES
ET LA RÉACTION TOXINE-ANTITOXINE

2^e THÈSE. *Propositions données par la Faculté*



Soutenues le 11 juin 1958 devant la Commission d'Examen

MM. WURMSER

Président

TONNELAT
LEDERER

{ *Examineurs*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

DOYEN J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse sup. et Alg. sup.	GRIVET	T Radioélectricité
FOCH	T Méc. phys. et expérimentale	PONCIN	T Méc. des fluides
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale	DUBREIL	T Arith. et théorie des nombres
DE BROGLIE	T Théories physiques	QUELET	T Chimie organique
PRENANT	T Anat. et Histol. comparées	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
GARNIER	T Géométrie supérieure	CHAMPETIER	T Chimie macromoléc. appl.
PÉRÈS	T Méc. des fluides et appl.	CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appl.
LAUGIER	T Physiologie générale	JUNG	T Pétrographie
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.)	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique
BARRABE	T Géol. struct. et Géol. appl.	WIEMANN	T Chimie organ. et structurale
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique Math.	JACQUINOT	T Spectrosc. et Phys. céleste
J. BOURCART	T Géogr. phys. et Géol. dynamique	VASSY	T Phys. de l'atmosphère
PLANTEFOL	T Botanique	DESTOUCHES	T Théories physiques
GRASSÉ	T Evol. des êtres organ.	M. PRUVOST	T Géologie
PRÉVOST	T Chimie organique	AMIEL	T Chimie générale (P.C.B.)
BOULIGAND	T Appl. de l'anal. à la Géom.	HOCART	T Minéralogie
CHAUDRON	T Chimie appliquée	J. P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.)
WYART	T Minéralogie	COUTEAUX	T Biol. animale (P.C.B.)
TEISSIER	T Zoologie	MAY	T Biol. animale (P.C.B.)
MANGENOT	T Biologie végétale	CHOQUET	T Calc. diff. et Intégral
P. AUGER	T Phys. quant. et Relativité	FELDMANN	T Biologie (P.C.B.)
MONNIER	T Physiol. des fonctions	GUINIER	T Physique générale (P.C.B.)
PIVETEAU	T Paléontologie	JOST	T Physiologie comparée
ROCARD	T Physique (E.N.S.)	FORTET	T Calc. des probabilités
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)	SCHWARTZ	T Méth. Math. de la phys.
LAFFITTE	T Chimie Générale	CHOUARD	T Physiologie Végétale
FAVARD	T Mécanique Générale	MALAVARD	T Aviation
COULOMB	T Physique du Globe	BRELOT	T Calcul différentiel
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.)	NORMANT	T Chimie organique (P.C.B.)
CHRÉTIEN	T Chimie minérale	BENARD	T Chimie (P.C.B.)
P. DRACH	T Zoologie	BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
KASTLER	T Physique	DUGUE	T Statistiques mathém.
EPHRUSSI	T Génétique	GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)
WURMSER	T Biol. physico-chimique	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.)	ULRICH	T Physiol. Végétale
GAUTHERET	T Biol. Végétale (P.C.B.)	MARÉCHAL	T Optique théorique et appl.
LUCAS	T Recherches physiques	KIRRMANN	T Théories chimiques
A. THOMAS	T Biologie cellulaire	CHADEFAUD	T Botanique
ARNULF	T Optique appliquée	DESTRIAU	T Physique (M.P.C.)
M. MORAND	T Enseignement de Phys.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale
SOLEILLET	T Physique	SALEM	T Mathém. générales
FORTIER	T Méc. exper. des fluides	LELONG	T Mathém. générales
DANJON	T Astronomie	DEVILLERS	T Anat. et Histol. comparées
LAPORTE	T Phys. générale et Radio-activité	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
JANET	T. Méc. anal. et Méc. céleste	FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.)
PETIT	T Biol. maritime	GLANGEAUD	T Géogr. physique et Géol. dynamique
QUENEY	T Météorologie et dyn. atmosphérique	GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.)
GALLIEN	T Embryologie	PISOT	T Calcul des Probabilités
EICHORN	T Biol. Vég. (P.C.B.)	ROCH (E.)	T Géologie
DE CUGNAC	T Biol. Vég. (P.C.B.)	SCHATZMANN	T Astrophysique
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie Physique	TERMIER	T Paléontologie stratigr.
THELLIER	T Physique du Globe	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
L'HÉRITIER	T Génétique	JOLIOT	T Phys. nucl. et Radioactivité
		LENNUIER	T Physique (P.C.B.)
		RIZET	T Génétique

M ^{me} TONNELAT ...	Théories physiques	ROUAULT	T Physique (Enseignement)
DIXMIER	Mathématiques (M.P.C.)	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
SOUCHAY	Chimie générale (P.C.B.)	BARCHIEWITZ	Chimie Physique
AIGRAIN	Physique (P.C.B.)	BROSSEL	Physique atomique
BRUSSET	Chimie minérale	BUSER	Biologie animale (P.C.B.)
M. LEVY	Physique théorique	CAMUS	Biologie végétale (P.C.B.)
LENORMANT	Physiologie	CASTAING	Physique générale
M ^{me} CHAIX	Chimie biologique	CURIEN	Minéralogie et Cristallog.
M ^{me} HUREL-PY .	Biol. Végétale (P.C.B.)	MOYSE	Physiologie végétale
PIAUX	Chimie (P.C.B.)	NOIROT	Evolution des Etres organ.
BRUN	Méc. exper. des fluides	PANNETIER	Chimie (P.C.B.)
LEDERER	T Chimie biologique	POSSOMPES	Biol. Animale (P.C.B.)
M ^{me} DUBREIL ...	T Mathématiques	PULLMANN	Chimie théorique
M ^{me} LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)	TEILLAC	Physique Nucléaire et Ra-
BELLAIR	Géologie (S.P.C.N.)		dioactivité
COTTE	T Physique (M.P.C.)	TONNELAT	Biologie Physico-chimique
DUBOIS J. E.	T Chimie (S.P.C.N.)	VILLE	Econométrie
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)	WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
MICHEL	T Chimie (S.P.C.N.)	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
OLMER	T Energétique générale		

Secrétaire Général C. MONIER

Ce travail a été effectué dans le Service des Anaérobies et de Chimie microbienne de l'Institut Pasteur (Annexe de Garches).

Nous tenons à témoigner ici notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Raynaud, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui nous a accueilli dans son laboratoire et qui a bien voulu diriger ces travaux et nous prodiguer toujours ses précieux conseils. Nous adressons également tous nos remerciements à Monsieur le Docteur Prévot, Chef de Service, qui a bien voulu nous accueillir dans son Service et compléter notre formation de bactériologiste.

Nous tenons à exprimer tous nos remerciements à Monsieur le Professeur Wurmser, qui a bien voulu s'intéresser à cette étude et présider cette thèse. Nous remercions Messieurs les Professeurs Lederer et Tonnelat d'avoir accepté de faire partie de notre jury.

Nous adressons nos remerciements respectueux à Monsieur le Professeur Tréfouël, Directeur de l'Institut Pasteur, qui nous a fait le grand honneur de nous accepter à l'Institut Pasteur et de nous faire bénéficier de tous les moyens mis à la disposition de ses chercheurs.

Monsieur le Docteur Aublant nous a accordé son bienveillant appui. Qu'il soit assuré ici de notre respectueux attachement. Le Docteur Grabar nous a toujours prodigué ses précieux conseils et nous a initié à la technique de l'immuno-électrophorèse. Nous sommes heureux de lui exprimer ici toute notre reconnaissance.

Nous tenons à remercier les Professeurs de la Faculté des Sciences d'Amsterdam qui nous ont fait profiter de leur grande expérience et nous ont orienté vers la recherche scientifique, en particulier Monsieur le Professeur Kingma Boltjes dont nous avons été l'élève et auquel nous devons notre formation de microbiologiste.

Nous remercions Messieurs Nicol, Girard et Corvazier, Docteurs-Vétérinaires de l'Institut Pasteur à Garches, pour toute l'aide apportée dans l'hyperimmunisation des chevaux.

Que tous mes collègues du laboratoire soient assurés de notre sincère gratitude pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans ce travail. Nous remercions tout spécialement Monsieur Turpin, Chef de Laboratoire, qui a bien voulu aider à la rédaction de ce manuscrit, et Madame Blass, Mademoiselle Digeon, Messieurs Bizzini, Mangalo, Alouf et Ben Ephraïm qui nous ont aimablement assisté.

Nous n'oublions pas la collaboration efficace et dévouée de Mademoiselle Bepoldin, sans oublier l'aide de Madame Riza, de Monsieur Sandev et Monsieur Péry. Nous remercions Mademoiselle Schmaevsky qui a bien voulu se charger de la dactylographie du manuscrit.

A ma femme,

A ma fille,

A nos parents



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545923_0002

INTRODUCTION

Corynebacterium diphtheriae, le microbe qui provoque la diphtérie, maladie connue depuis longtemps, entraîne la formation de pseudo-membranes sur les muqueuses des voies respiratoires : la gorge, le nez, le larynx et les amygdales. Klebs observa, en 1883, la bactérie en forme de bâtonnet dans les coupes des fausses membranes et Loeffler l'isola en 1884.

On distingue d'après la forme des colonies bactériennes sur les milieux d'isolement appropriés, trois types désignés sous les noms : *gravis*, *mitis* et *intermedius*; les caractères biochimiques de ces trois variétés sont différents.

Après l'isolement du germe, se posait la question du pouvoir pathogène si puissant de cette bactérie qu'on trouvait seulement dans la gorge. C'est aussi Loeffler qui, sans pouvoir en donner la preuve, émit l'hypothèse qu'il devait y avoir sécrétion d'une toxine à partir des germes.

En 1888, Roux et Yersin démontrèrent l'existence de la toxine. Les milieux de culture, débarrassés des germes et injectés aux animaux, provoquèrent les mêmes manifestations pathologiques que ceux observés chez les sujets ayant succombé à la maladie.

L'antitoxine diphtérique fut découverte en 1890 par von Behring et Kitasato; ils montrèrent que les animaux qui n'avaient pas succombé à une infection résistaient ensuite à l'inoculation des germes et de la toxine. Le sang de ces animaux contenait une antitoxine capable de neutraliser la toxine et il devint possible de protéger d'autres animaux avec le sérum des animaux guéris.

La mise au point de techniques d'immunisation capables de fournir chez le cheval de grandes quantités de sérum a permis l'application pratique de la sérothérapie. L'injection de l'antitoxine dans un but thérapeutique ou prophylactique amène une immunité dont la durée est très courte; après peu de temps, les anticorps sont détruits et disparaissent. L'obtention d'une immunité durable se fait uniquement après contact de l'organisme avec l'antigène (toxine ou dérivé atoxique). Un contact antérieur avec la toxine est suivi d'une production rapide d'antitoxine.

Pour la production de sérum contenant des titres élevés d'antitoxine, il est nécessaire d'effectuer un grand nombre d'injections avec des quantités croissantes d'antigène. La vaccination humaine ainsi que la production d'anticorps ne peuvent pas être faites avec la toxine et on a essayé par différentes méthodes de transformer

la toxine en dérivé atoxique tout en lui conservant son pouvoir antigénique. Les résultats obtenus furent longtemps insatisfaisants.

On a employé des toxines transformées par des moyens chimiques et physiques ainsi que des mélanges presque neutres de toxine et d'antitoxine diphtériques. Le problème trouva sa solution dans la découverte des anatoxines obtenues par l'action du formol sur les toxines. Il a été ensuite démontré que l'adsorption de l'anatoxine sur l'alun ou le phosphate d'aluminium produisait un vaccin dont le pouvoir antigénique était nettement plus élevé. L'emploi des vaccins adsorbés pour l'immunisation ou la production d'anticorps est maintenant d'usage courant.

Les méthodes de purification de la toxine et de l'antitoxine ont fait l'objet de nombreuses recherches.

La vaccination avec des préparations non purifiées d'anatoxine était souvent suivie de réactions de sensibilisation chez les adultes; il fut supposé que l'emploi d'anatoxine purifiée diminuerait beaucoup le nombre de cas. L'étude de l'action biologique de la toxine et de la réaction toxine-antitoxine pouvait seulement être envisagée avec de grandes quantités de toxine pure. Les milieux habituels utilisés pour la production étant trop complexes pour la purification de la toxine, on a cherché à composer des milieux plus simples. Des milieux semi-synthétiques à base d'hydrolysate de caséine ainsi que des milieux entièrement synthétiques ont été mis au point. L'influence du fer a été démontrée. L'obtention de la toxine diphtérique sous forme de cristaux titrant 3 000 UF/mgN est de date récente. L'injection d'un sérum « hyperimmun » pour le traitement ou la prévention d'une maladie entraîne toujours le risque de réactions sériques. Des méthodes de purification des anticorps en vue d'applications pratiques, visent surtout à obtenir des préparations de valeur antitoxique élevée et ayant perdu leur activité d'espèce.

Diverses méthodes de purification de protéines ont été appliquées à la purification d'anticorps, elles ont été abandonnées en faveur de la digestion pepsique du sérum suivie d'une coagulation spécifique des protéines non-antitoxiques. La digestion du précipité spécifique antitoxine-anatoxine permettant de récupérer l'antitoxine, donne des antitoxines très purifiées, mais n'est pas encore entrée dans le domaine pratique.

La réaction toxine-antitoxine diphtériques a déjà fait l'objet de nombreuses études sans que les divers chercheurs aient pu se mettre d'accord sur les résultats obtenus.

Il est connu depuis fort longtemps que l'antitoxine diphtérique peut être retrouvée dans la fraction β -2-globuline ainsi que dans la fraction γ -globuline du sérum de cheval.

Certains auteurs ont trouvé pour les antitoxines- γ un rapport *in vivo/in vitro* élevé (environ 2), tandis que d'autres ont trouvé les valeurs généralement rencontrées qui sont celles des antitoxines β -2, soit environ 1.

En général, en fin d'immunisation chez le cheval, les antitoxines sont du type β -2, tandis que les antitoxines- γ sont presque uniquement rencontrées au début de l'hyperimmunisation.

La réaction toxine-antitoxine de cheval a été seulement étudiée avec les antitoxines de type β -2 ou les antitoxines digérées. La courbe obtenue a une forme particulière, elle présente une région rectiligne; le précipité est soluble dans un excès d'antigène et dans un excès d'anticorps; elle est désignée sous le nom de courbe de type floculation ou courbe de type cheval. Les courbes obtenues avec les

antitoxines humaines ou les antitoxines de lapin ont une forme arrondie, le précipité est insoluble dans un excès d'anticorps. On les appelle habituellement courbes de type précipitine ou type lapin.

D'après Pappenheimer, il est possible de calculer, à l'aide de la pente de la courbe de précipitation spécifique toxine-antitoxine de cheval, la pureté immunologique de la préparation (le nombre d'unités de floculation par mg d'azote). Ces calculs ne sont valables que dans certaines conditions expérimentales très limitatives que nous définirons dans la suite de notre exposé. Ces conditions ne peuvent en effet être précisées qu'après discussion des caractères de pureté de la toxine d'une part, de la forme de la courbe de précipitation quantitative d'autre part.

Plan de travail

Nous nous sommes proposé d'étudier la préparation de la toxine diphtérique sur des milieux simples et de chercher les conditions nécessaires pour obtenir des cultures où la toxine sera présentée en quantités élevées et où le taux des autres protéines sera aussi bas que possible. A partir de ces toxines brutes, nous avons mis au point une technique de purification simple, rapide, facilement reproductible et donnant un haut rendement en toxine pure. Quelques caractères chimiques, physico-chimiques et immuno-chimiques ainsi que biologiques de la toxine ont été étudiés.

Nous avons appliqué à l'étude de la toxine et de l'antitoxine diphtériques les techniques de diffusion en gélose : diffusion simple, double diffusion et immuno-électrophorèse. Nous avons étudié l'hyperimmunisation des chevaux et des lapins avec cette toxine de haute pureté. Nous avons, entre autres, pris comme adjuvant le phosphate de calcium préparé par une nouvelle technique.

La présence d'antitoxines de type β -2 et de type γ -globulines a été mise en évidence, leurs rapports *in vivo/in vitro* étudiés. Nous avons examiné la production d'anticorps chez des chevaux avec et sans immunité de base. Nous avons étudié la purification des anticorps ainsi préparés par digestion du précipité spécifique. La réaction toxine-antitoxines a été étudiée avec d'une part, la toxine pure, et d'autre part, les diverses antitoxines préparées par nos soins. Nous avons également employé une toxine pure marquée à l' ^{131}I .

La présence de plusieurs motifs antigéniques distincts présents sur la molécule de toxine a été démontrée. Les divers anticorps correspondants spécifiquement dirigés contre ces motifs antigéniques ont été mis en évidence dans les sérums antidiphtériques. Les résultats de ces expériences ont permis de former une hypothèse nouvelle sur le mode d'action des anticorps neutralisant la toxine.

Une remarque préliminaire très importante de terminologie doit être faite ici. Nous appelons anticorps antitoxine diphtérique (A), ou de façon abrégée, antitoxine anti-diphtérique ou antitoxine, tous les anticorps qui peuvent être formés chez l'animal à la suite de l'injection de la toxine diphtérique pure ou de l'anatoxine correspondante. Ces anticorps sont définis par la propriété qu'ils présentent de se combiner spécifiquement dans le sens immunologique ordinaire, avec la toxine, considérée comme une protéine constituée de molécules de structure bien définie et semblables entre elles.

Les anticorps antidiphtériques sont ainsi assimilés aux anticorps dirigés contre des protéines ordinaires dépourvues d'activité biologique spécifique (exemple serum-albumine). Les anticorps antidiphtériques ainsi définis peuvent être précipitants ou non précipitants, neutralisants ou non neutralisants, pourvu qu'ils possèdent la propriété de combinaison spécifique. L'activité neutralisante n'intervient donc pas dans cette définition. C'est un fait bien connu que les anticorps antidiphtériques définis comme nous l'avons fait, sont en général neutralisants. Nous montrerons cependant qu'il existe des anticorps spécifiques dirigés contre la toxine diphtérique, capables de se combiner avec elle, mais incapables de la neutraliser, phénomène analogue à celui qui a été assez souvent observé dans le cas des anticorps antienzymes. C'est cette observation qui nous a amenés à adopter cette nouvelle définition très générale des anticorps antidiphtériques. Les anticorps qui neutralisent l'activité de la toxine, seront explicitement appelés anticorps antidiphtériques neutralisants ou antitoxine neutralisante.

Préparation de la toxine diphtérique

1. INTRODUCTION

La production de la toxine diphtérique se fait en milieu liquide. Suivant les produits de base servant à la préparation de ces milieux, on distingue trois types de milieux : a) les milieux à base de peptone et d'extraits de viande; b) les milieux à base d'hydrolysats de caséine ou de gélatine; c) les milieux synthétiques. Les plus anciens sont les milieux à base de peptone et d'extraits de viande. Les premières toxines étaient préparées sur des bouillons couramment utilisés dans les laboratoires.

Un milieu à base de peptone obtenu par digestion pepsique de panse de porc a été décrit par Martin (168) en 1898. Des modifications ont été apportées à ce milieu par Loiseau et Philippe (150, 151, 152, 153, 154, 155). Ce milieu est utilisé à l'Institut Pasteur de Paris pour la production de la toxine diphtérique qui sert à la préparation des vaccins et à l'hyperimmunisation des chevaux. C'est aussi l'un des milieux que nous avons employés pour la préparation de la toxine destinée à la purification. Un autre milieu à base de peptone est celui de Wadsworth et Wheeler (296), décrit en 1928.

Il est tout à fait naturel que les différents chercheurs aient essayé de remplacer ces milieux chimiquement non définis par des milieux plus simples. Un milieu à base d'extrait de foie, d'acides aminés et de sels a d'abord été mis au point par Mueller (178) en 1935. Il a été démontré par Pappenheimer et Johnson (204) que l'hydrolysat de gélatine peut remplacer les acides aminés. Pappenheimer, Mueller et Cohen ont réalisé en 1937 (207) un milieu synthétique dans lequel l'extrait de foie a été remplacé par la β -alanine, l'acide pimélique et l'acide nicotinique.

Le premier milieu à base d'hydrolysat de caséine a été mis au point par Mueller en 1939 (179). Ce milieu donnait 60 UF/ml. Mueller et Miller (180) ont pu augmenter le rendement en toxine par une réduction de la concentration en NaCl et en ions de potassium. Ils ont obtenu 100 unités de floculation par ml. D'autres milieux à base d'hydrolysat de caséine furent décrits par Norlin en 1947 (188),

Holt (113) en 1950, et Levine et ses collaborateurs (142). En 1949, Ramshorst (254) réalisa une modification du milieu de Levine et obtint un très bon rendement en toxine. Nous signalerons aussi le milieu de Pope et Llewellyn-Smith (221) à base de viande de cheval digérée par un extrait du pancréas. On y ajoute de la levure.

Un milieu entièrement synthétique fit, en 1951, l'objet d'une publication par Drew et Mueller (61). C'est aussi en 1951 que Yoneda (311, 312) put isoler des mutants de la souche Toronto poussant sur des milieux très simples. L'un des milieux contenait, outre les facteurs de croissance habituels, de la méthionine, de l'asparagine et de la cystine; l'autre de la méthionine, de l'asparagine et du thioglycollate de sodium.

2. INFLUENCE DU FER ET D'AUTRES MÉTAUX SUR LA FORMATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

Il a souvent été constaté que la production de la toxine dans des milieux apparemment de bonne qualité pouvait présenter des variations inattendues.

En 1931, Locke et Main (148) notèrent l'influence du fer sur la production de la toxine. Si l'on ajoute 5 000 gamma de fer à un milieu à base de viande, contenant 100 à 400 gamma de fer par litre et donnant 600 à 800 MLD/ml, on retrouve moins de 20 MLD/ml. Le même fait fut constaté par Pope en 1932 (222). L'addition de 2 000 gamma de fer par litre de milieu fait tomber le titre en UF à une valeur nulle. Scheff G. et Scheff I. en 1934 (270), Strøm en 1935 (284) et Pappenheimer en 1936 (203) notèrent le même phénomène.

Pappenheimer et Johnson (202) étudièrent l'influence du fer et du cuivre sur la production de la toxine et trouvèrent que l'optimum de production de toxine se fait vers 140 gamma de fer par litre de milieu et qu'à 500 gamma, il n'y a plus formation de toxine, tandis que la sécrétion de porphyrine dans le milieu diminue. Pappenheimer et Hendee (210, 211), émirent l'hypothèse qu'il se forme à partir de chaque molécule de toxine, de quatre atomes de fer et de quatre molécules de porphyrine, un enzyme respiratoire. Cet enzyme serait le cytochrome b_1 . La formation de toxine est donc seulement possible si le milieu ne contient pas de fer qui donne lieu à cette réaction.

3. INFLUENCE DU pH SUR LA CROISSANCE DU BACILLE DIPHTÉRIQUE

Le pH d'un milieu est en relation directe avec la source d'énergie qu'on ajoute à ce milieu. Le bacille diphtérique peut utiliser comme source d'énergie le glucose, le maltose, le lactose, les acides acétique, malique et succinique.

Si l'on utilise le glucose, le pH de départ doit être suffisamment élevé (entre 8 et 9) parce qu'après un certain temps de culture, il y a une forte baisse de pH due à l'acidification du milieu. Si le pH de départ est trop bas, le milieu devient trop acide et la croissance s'arrête. Si l'on utilise le maltose, l'acidification est beaucoup plus faible et le pH du milieu au départ peut être d'environ 7,6. C'est certainement le maltose qui convient le mieux à la production de la toxine diphtérique. Avec l'acétate ou le lactate de sodium, il n'y a pas de phase acide.

4. SOUCHES EMPLOYÉES POUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

Toutes les souches utilisées pour la production de la toxine diphtérique sont des variétés de la souche isolée par Park et Williams en 1896. La souche qui a servi à nos expériences est la Toronto n° 8. La culture de cette souche dans les différents laboratoires a amené des différenciations soit des besoins nutritifs, soit de la production de la toxine. On connaît maintenant des variétés qui sont bonnes productrices de toxine dans un milieu et ne le sont pas dans un autre. La souche Toronto, par exemple, ne pousse pas sur le milieu Yoneda, alors que la variété SM 1 y produit une bonne toxine. Une difficulté souvent rencontrée est la perte du pouvoir toxigène au cours des différents repiquages.

Une étude sur la sélection des souches par rapport à leur pouvoir toxigène a été faite par Amiens (4). En partant d'une souche CN 77, l'auteur a pu isoler diverses variantes, dont une avait perdu le pouvoir toxigène. Le milieu devenait acide et cette phase d'acidification n'était pas suivie d'alcalinisation du milieu. Les souches qui possédaient un bon pouvoir toxigène le perdaient progressivement. Le caractère toxigène doit être contrôlé très régulièrement. La sélection des souches a été aussi décrite en détail par van Ramshorst (254).

5. CONSIDÉRATIONS SUR LA MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE A BASE D'HYDROLYSAT DE CASÉINE

Le milieu d'hydrolysat de caséine-acide glutamique que nous avons utilisé pour la production de la toxine diphtérique est un milieu de type Mueller-Miller (180) modifié selon les observations de Holt (113) : si l'on augmente trop la teneur en hydrolysat de caséine du milieu, les rapports Lf/mg N et Lf/ml du milieu baissent; l'optimum de toxinogénèse est obtenu par 0,5 % de NaCl environ, comme déjà indiqué par Mueller et Johnson (181) ; l'addition d'acide glutamique à des milieux complexes de concentration « naturelle » en acide glutamique faible, provoque une augmentation de la formation de toxine sans faire baisser le rapport UF/mg N du milieu. L'optimum pour un milieu contenant 0,1 % d'azote provenant de l'hydrolysat de caséine est de 0,30 % d'acide glutamique.

Nous avons donc mis au point un milieu pouvant être facilement préparé, même en très grandes quantités. Nous l'avons réalisé : a) en utilisant de l'hydrolysat de caséine commercial; b) en effectuant toutes les opérations chimiques sur une solution concentrée et en la diluant avec de l'eau distillée pour obtenir le milieu final. Ces solutions concentrées peuvent être facilement stockées. Nous donnerons en détail la préparation de ce milieu.

6. DESCRIPTION DU MILIEU A BASE D'HYDROLYSAT
DE CASÉINE - ACIDE GLUTAMIQUE
EMPLOYÉ POUR LA PRÉPARATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

Solution 1.

Quantités pour 50 litres de milieu final : 500 g d'hydrolysate de caséine (Hydrolysate enzymatique de caséine préparé par l'Industrie Biologique Française, ou Bactocase Difco) sont dissous dans 4 litres d'eau distillée bouillante et agités au bain-marie. Les éléments insolubles sont éliminés par filtration sur papier. On prépare d'autre part une solution contenant 200 g de chlorhydrate d'acide L(+)-glutamique dans 2 litres d'eau distillée. Les deux solutions sont mélangées et on y ajoute 400 ml de la solution de phosphates de composition :

PO_4KH_2	42,5 g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}, 12\text{H}_2\text{O}$	312,5 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

On ajoute sous agitation 50 ml d'une solution de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à 10 % et de l'eau distillée pour porter le volume à 10 litres. Le pH est ajusté à 7,6 avec de la lessive de soude. La solution est chauffée au bain-marie à 80° pendant 5 à 10 minutes et filtrée sur papier. Après refroidissement, on ajoute encore 25 ml de la solution de chlorure de calcium. Le pH est réajusté à 7,6 et on porte à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. On filtre sur papier à la sortie de l'autoclave le liquide encore chaud. La solution stock ainsi préparée est concentrée 5 fois par rapport au milieu final. Si l'on n'utilise pas immédiatement toute la solution, on peut la répartir en flacons, qui seront stérilisés, on peut encore y ajouter une petite quantité de chloroforme et la conserver à froid.

La détermination du taux de fer résiduel de cette solution concentrée est à conseiller; il doit y avoir en principe moins de 200 µg de fer par litre.

Solution 2.

$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	22,5 g
Acide nicotinique	0,115 g
β-alanine	0,115 g
Acide pimélique	0,0075 g
Thiamine	0,0125 g
$\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$ (solution à 1 %) ...	5 ml
$\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$ (solution à 1 %) ..	4 ml
$\text{Cl}_2\text{Mn}, 4\text{H}_2\text{O}$ (solution à 1 %) ..	1,5 ml
HCl concentré (redistillé)	3 ml
H_2O q.s.p.	100 ml

L'acide nicotinique est dissous dans 1 ml de HCl concentré et ajouté à la solution.

Solution 3.

20 g de L(—)cystine sont dissous dans un mélange bouillant de 20 ml HCL concentré et 20 ml d'eau distillée, et complétés à 100 ml. Employer de la cystine chimiquement pure.

Solution 4 (maltose).

500 g de maltose sont dissous dans de l'eau bouillante et ajusté à 800 ml. On ajoute 5 g de CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ et 200 ml d'une solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, $12\text{H}_2\text{O}$ à 10 %. Ajuster le pH à 7,6 avec de la soude 10 N. Chauffer au bain-marie jusqu'à 60° . Filtrer aussitôt sur papier. Réajuster le pH à 6,6-6,8. Stériliser par filtration sur bougie.

Solution de fer.

SO_4Fe , $7\text{H}_2\text{O}$	4,98 g
HCl concentré	2 ml
H_2O q.s.p.	100 ml

Diluée 100 fois, cette solution contient 100 γ de fer par ml.

Le milieu final est préparé de la façon suivante :

Solution stock n° 1	200 ml
Solution n° 2	2 ml
Solution n° 3	2 ml
Solution de fer diluée au 1/100 q.s.p. .	optimum de toxinogénèse
NaCl q.s.p.	concentration finale 0,5 %

Compléter à un litre avec de l'eau distillée et ajuster le pH à 7,6 avec de la soude 10 N. Le milieu final contient environ 1,77 mg N/ml et 2,65 g NaCl par litre.

Le milieu est réparti dans des ballons de Fernbach de 2 litres (diamètre des ballons : 21 cm, hauteur : 10 cm), à raison de 250 ml par ballon. On peut également utiliser des boîtes de Roux type Tasman (boîtes de Roux ordinaires à col relevé), qu'on peut empiler dans un espace réduit : 200 ml de milieu par boîte de 20×12 cm. Le milieu réparti est stérilisé pendant 20 minutes à 115° ; après stérilisation, on laisse le milieu au repos pendant 24 h, et on ajoute stérilement la solution de maltose, 28 ml par litre de milieu.

Semence.

On utilise comme semence une culture agitée de 24 à 48 heures sur le même milieu. On peut utiliser une culture non agitée de 2 à 3 jours. Onensemence 1 cm^3 de culture par Fernbach.

Remarques.

L'eau distillée utilisée pour la préparation du milieu doit être exempte de fer. L'acide glutamique commercial est recristallisé sous forme de chlorhydrate. Toute la verrerie et les filtres sont lavés avec une solution chaude d'acide chlorhydrique environ normal.

Les boîtes de Roux et les ballons de Fernbach sont utilisés exclusivement pour la production de la toxine diphtérique, ils sont nettoyés par de l'acide chlorhydrique normal sous 1 cm de hauteur et portés à l'autoclave. Ils n'entrent jamais en contact avec le mélange sulfo-chromique couramment utilisé dans le laboratoire pour le nettoyage de la verrerie.

Pour chaque quantité « stock » de milieu hydrolysât de caséine-acide glutamique, on fait d'abord une expérience préliminaire pour déterminer l'optimum de fer du milieu final.

Le tableau 1 donne les résultats d'une telle expérience, obtenue avec l'une de nos préparations concentrées après 8 jours de culture à 37°.

TABLEAU 1

<i>Fer ajouté (microgrammes par litre)</i>	<i>UF/ml</i>
0	10
60	40
120	57,5
160	62,5
210	45
400	0

On voit que l'optimum est à environ 160 microgrammes de fer par litre de milieu et que le titre baisse rapidement si l'on dépasse ce seuil.

7. CONDITIONS DE CULTURE

Dans une étude détaillée sur la production de la toxine diphtérique, van Ramshorst (254) constate qu'avec un milieu à base d'hydrolysât de caséine, le taux de fer qui permet l'obtention de la concentration la plus élevée possible de toxine est plus grand que le taux de fer qui permet d'obtenir la toxine la plus pure. La concentration optimale pour obtenir une toxine aussi pure que possible est comprise entre 50 et 100 γ de fer ajouté par litre de milieu. L'optimum de fer pour la formation du maximum possible de toxine est un peu plus élevé.

Nous avons refait ces expériences avec le milieu hydrolysât de caséine-acide glutamique que nous venons de décrire. Puisque la quasi-totalité de la toxine était destinée à la purification, il nous a semblé plus avantageux de partir d'un produit de base aussi pur que possible, même s'il fallait pour cela sacrifier le rendement. Le tableau 2 reproduit les résultats de ces expériences et montre qu'il est effectivement intéressant de rester juste au-dessous de l'optimum de toxinogénèse, car on obtient un produit de départ plus pur. Nous avons également étudié avec le même milieu l'influence du temps sur la production de toxine et sa pureté (deux concentrations au-dessous de l'optimum de fer).

C'est également van Ramshorst (254) qui nota qu'avec le milieu de Pope, la valeur Lf/mg N.P. * (pureté de la toxine) augmente avec le temps pour s'abaisser ensuite. Avec le milieu à base d'hydrolysât de caséine, cette valeur reste à peu près constante pendant les premiers jours de culture pour baisser lentement ensuite. Le premier fait est assez facile à expliquer. Le milieu de Pope à base de viande contient certainement une petite quantité de polypeptides qui sont précipités par

* Unités de floculation par mg d'azote protéique.

TABLEAU 2. Influence du fer sur la production de la toxine diphtérique

<i>Fer ajouté</i> <i>γ/litre</i>	<i>UF/ml</i>	<i>mg N.P./ml</i>	<i>UF/mg N.P.</i>
0	7,5	0,0125	
50	17	0,0145	1 170
100	65	0,0560	1 160
150	75	0,0567	1 320
200	85	0,0780	1 090
250	85	0,0750	1 060
500	20	0,0505	400
1 000	0	0,0440	

Résultats obtenus après culture de huit jours sur milieu hydrolysât de caséine. Taux de fer résiduel dans le milieu : 8 γ/litre.

l'acide trichloracétique et qui font partie de l'azote protéique du milieu. C'est pour cette raison que le rapport UF/mg N.P. est plus bas en début de culture. Ce n'est pas le cas pour le milieu à base d'hydrolysât de caséine, aussi le rapport UF/mg N.P. varie-t-il peu.

Morton et Gonzalez (177) ainsi que Raynaud *et al.* (255) ont démontré que la toxine est sécrétée pendant la phase exponentielle; la quantité de toxine présente dans les germes à la fin de la croissance est très faible, contrairement à l'opinion d'autres auteurs (313).

Le processus d'autolyse qui, dans le cas de la toxine diphtérique (et contrairement à ce que l'on observe chez les toxines des Clostridies anaérobies) ne libère pas de toxine, fait baisser le rapport UF/mg N.P.

TABLEAU 3. Influence du temps sur la production de la toxine diphtérique

<i>Temps</i> <i>en jours</i>	<i>UF/ml</i>	<i>mg N.P./ml</i>	<i>UF/mg N.P.</i>
Fer ajouté : 100 γ/litre			
4	37,5	0,0325	1 150
6	57,5	0,0520	1 100
8	65	0,0560	1 160
11	75	0,0690	1 085
Fer ajouté : 150 γ/litre			
4	50	0,0403	1 240
6	70	0,0567	1 230
8	75	0,0567	1 320
11	75	0,0630	1 190

Le tableau 3 donne les résultats obtenus sur milieu hydrolysât de caséine-acide glutamique. On constate que pendant les 8 premiers jours de culture, le rapport UF/mg N.P. varie peu et qu'il y a une faible baisse après le huitième jour. Ces expériences montrent que la meilleure toxine destinée à une purification est obtenue après 8 jours dans un milieu de culture contenant 160 γ de fer par litre.

8. RÉSUMÉ

La production de toxine diphtérique a été étudiée et un milieu de culture à base d'hydrolysât de caséine décrit. Les conditions optima de culture ont été déterminées. Pour obtenir une toxine de départ aussi pure que possible, la production doit se faire au-dessous de l'optimum de fer. L'emploi de cultures de 8 jours est à conseiller.

Purification de la toxine diphtérique

1. INTRODUCTION

La purification de la toxine diphtérique a déjà fait l'objet de nombreuses études et présente un intérêt à la fois théorique et pratique. Du point de vue pratique, vaccination et production de sérum antidiphtérique sont les plus importants; les résultats obtenus sont nombreux et bien connus, mais il reste néanmoins certains points à élucider.

Les filtrats de culture du bacille diphtérique, à l'optimum de toxinogénèse, contiennent, outre la toxine, tous les autres produits sécrétés par le germe, tels des protéines, des porphyrines, des enzymes, des flavines et naturellement les constituants du milieu de culture.

Il est important que le vaccin contienne tous les composants antigéniques ou le composant antigénique essentiel pour assurer une immunité efficace, mais il est également important d'enlever tous ceux qui ne jouent pas de rôle dans la défense contre une infection éventuelle et qui, au contraire, peuvent donner des réactions chez des sujets sensibilisés. La concurrence antigénique joue également un rôle dans la production des anticorps et par conséquent dans l'immunité obtenue, et c'est une raison de plus pour supprimer les antigènes non essentiels. La toxine diphtérique est le premier et pratiquement le seul agent, responsable des symptômes cliniques graves de cette maladie. Le moyen de défense essentiel contre la maladie doit donc être la neutralisation de la toxine par l'antitoxine.

L'immunité à réaliser doit donc surtout être une immunité antitoxique. Il faut alors se poser la question essentielle suivante : existe-t-il une ou plusieurs toxines ? Sans entrer dans le détail de ce problème, nous pouvons dire que, si le pouvoir toxigène des divers types de *Corynebacterium Diphtheriae* et des diverses souches est différente, la toxine a toujours été neutralisée par l'antitoxine étalon. De plus, les anti-sérums produits avec la toxine pure ont toujours neutralisé la toxine brute. Les méthodes immunologiques (voir chapitre V) ont démontré qu'au début de l'hyperimmunisation, ces antisérums contenaient seulement l'antitoxine antidiphtérique et il est donc normal de supposer qu'il n'existe qu'une toxine diphtérique responsable de l'action du germe.

Certains auteurs, entre autres O'Meara (195) et Niggemeyer (187) ont supposé que les souches gravis contenaient une deuxième substance qui augmenterait les effets toxiques produits par la toxine ordinaire, mais ceci n'a jamais été prouvé d'une façon certaine. On a souvent constaté des différences entre le pouvoir pathogène des trois types de *C. diphtheriae*. Ces divergences ne semblent pas être en rapport avec le type des colonies (on connaît des souches gravis avirulentes) mais seraient dues à la présence d'un certain phage tempéré. Les réactions de sensibilisation peuvent être dues soit à l'anatoxine, soit aux autres antigènes présents dans le filtrat de culture, ou aux deux. Une étude détaillée de ce sujet a été faite par Pappenheimer et Lawrence (140, 212, 213) qui ont démontré que l'anatoxine ainsi que les autres protéines du milieu peuvent donner des réactions du type tuberculine chez des sujets sensibilisés. L'utilisation de l'anatoxine purifiée diminuerait beaucoup le nombre de ces cas chez des adultes. L'emploi d'une anatoxine purifiée pour la vaccination est donc à conseiller.

Les problèmes théoriques sont loin d'être résolus et nous en sommes encore tout à fait au début de ces recherches. L'étude de la réaction toxine-antitoxine, de la composition chimique de la toxine, et de sa transformation en anatoxine, ainsi que son activité biologique, peuvent seulement être envisagées avec de grandes quantités de toxine pure. La mise au point de méthodes de purification simples et rapides est donc un premier pas à faire.

2. TECHNIQUES EMPLOYÉES

L'un des premiers à obtenir une préparation de toxine de haute pureté fut Eaton (63, 64). La toxine a été préparée sur un milieu à base de peptone, ce qui donne encore plus de mérite à ce travail, la purification à partir de ces milieux étant difficile. La toxine obtenue titrait 2 000 UF/mg N. La mise au point d'un milieu semi-synthétique à base d'hydrolysate de caséine a rendu la purification plus facile et Pappenheimer (206) a décrit en 1937 une préparation de 2 170 UF/mg N. D'autres auteurs, par des techniques différentes, obtinrent également des préparations ayant les mêmes activités. Citons les travaux de Agner (3), Ross (257), Levine, Wyman et Edsall (142) et Norlin (188). Ces chiffres ont, pendant une longue période, été considérée comme caractérisant la toxine pure, d'autant plus qu'ils étaient identiques à ceux calculés par Pappenheimer par la méthode de précipitation quantitative. Les préparations étaient homogènes à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation (209).

Des préparations de pureté beaucoup plus élevée ont été isolées récemment par nous et par d'autres auteurs. Lepow et Pillemer (141) en 1952 purent isoler des fractions titrant entre 2 400 et 2 600 UF/mg N et Pope *et al.* (226, 228) obtinrent des préparations titrant jusqu'à 3 200 UF/mg N et parvinrent également à cristalliser la toxine (228). Pope (226) a démontré, par la méthode de précipitation en gélose, que les préparations ayant une pureté de 2 170 UF/mg N contiennent encore plusieurs antigènes autres que la toxine, tandis que la cristallisation répétée donne des préparations à une seule ligne. Des préparations de même pureté ont été également obtenues par Norlin (189). La toxine pure a donc un titre variant autour de 3 000 UF/mg N.

Diverses techniques ont été employées pour la purification de la toxine. Nous citerons entre autres: a) le fractionnement par les sels neutres tels que le sulfate

d'ammonium; b) la précipitation par les acides; c) la précipitation par les solvants organiques; d) l'adsorption de la toxine ou des impuretés sur des hydroxydes, des sels de divers métaux et sur le charbon actif; e) l'ultrafiltration des filtrats de culture.

Le fractionnement des protéines par précipitation saline est l'une des techniques les plus utilisées et a le grand avantage d'être une méthode simple, tandis que la dénaturation est pratiquement nulle.

La solubilité des protéines peut s'exprimer par la formule de Cohn (50) :

$$\log. S = \beta - K_s \cdot \Gamma/2$$

où S est la solubilité de protéine en grammes par litre de solution saline concentrée, β une constante qui dépend de la protéine en solution, de la température et du pH; elle représente une solubilité hypothétique pour une force ionique nulle et est en général minimum aux environs du point isoélectrique de la protéine. $\Gamma/2$ est la force ionique égale à :

$$\Sigma \frac{1}{2} V_i^2 \cdot C_i \quad (2)$$

V_i étant la valence de chacun des ions de la solution et C_i la concentration correspondante en ion-grammes par litre.

La constante de précipitation K_s est fonction de la protéine et du sel utilisé pour la précipitation et est indépendant de la température et du pH. Une augmentation de cette constante signifie que la protéine précipite entre des concentrations plus rapprochées de sel. Parmi les sels couramment utilisés, ce sont les phosphates qui ont le K_s le plus élevé; viennent ensuite le sulfate de soude, le sulfate d'ammonium et le sulfate de magnésium.

Le logarithme de solubilité d'une protéine en fonction de la force ionique est donc une droite; la pente de cette droite dépend de la valeur du K_s de la protéine. La force ionique pour laquelle une protéine commence à précipiter est en relation avec sa concentration; une augmentation de la concentration en protéine signifie que la précipitation débute pour des concentrations plus faibles de sel. La formule de Cohn est une approximation seulement valable pour une protéine en solution. D'après Derrien (57), cette formule est également valable pour des mélanges de protéines et la courbe représentant la solubilité protéique en fonction de la force ionique est la somme de celles des protéines du mélange. Un changement de pente dans la représentation logarithmique indique le début de la précipitation d'une des protéines en solution.

La représentation graphique peut donc donner des renseignements utiles pour le fractionnement de certains mélanges de protéines et indiquer les concentrations en sel à utiliser pour des précipitations successives. En général, les changements de pente sont difficiles à déterminer et leur nombre est inférieur à celui des protéines en solution.

Le sel le plus utilisé dans la purification de la toxine diphtérique est le sulfate d'ammonium. La précipitation fractionnée à l'aide de ce sel a été étudiée en détail par Tasman et Brandwijk (285) qui trouvèrent qu'un fractionnement serré donne des produits plus purs, mais un rendement naturellement moins élevé. La pureté des préparations obtenues dépend du milieu de départ. Les concentrations de sel à utiliser ne sont pas les mêmes pour toutes les préparations et doivent être déterminées pour chacune d'elles.

Le fractionnement répété par le sulfate d'ammonium, combiné à l'adsorption des impuretés sur l'alumine C_γ , a été utilisé par Pappenheimer (204, 206), qui a obtenu des préparations titrant environ 2 200 UF/mg N. Lepow et Pillemer (141) ont combiné le fractionnement par le sulfate d'ammonium à la technique de précipitation par les solvants organiques, ce qui leur a permis d'obtenir des préparations de haute pureté. Norlin (189) a également obtenu des préparations de haute pureté par simple fractionnement par le sulfate d'ammonium de la toxine concentrée par ultra-filtration.

La toxine diphtérique est peu soluble aux environs de son point isoélectrique. On peut donc par simple abaissement du pH, précipiter la toxine. L'inconvénient de cette technique est qu'elle provoque une dénaturation, ce qui se manifeste par une perte de toxicité et du pouvoir floculant. Les acides utilisés ont été, entre autres, l'acide trichloracétique par Boivin et Izard (21) et par Norlin (188), l'acide acétique par Eaton (63) et par Rubinstein et coll. (260), l'acide chlorhydrique par Norlin (188), par Bunney et coll. (37), par Locke et Main (147) et par Glenly et Walpole (78). Certains auteurs ont obtenu de bons résultats, tandis que d'autres ont trouvé la toxine trop instable pour être précipitée par les acides.

La purification des diverses toxines et anatoxines par fractionnement avec des mélanges de méthanol-eau, dans des conditions bien déterminées de force ionique, de concentration de protéines et de température a été effectuée avec succès par Pillemer et ses collaborateurs (220). La purification de la toxine diphtérique par cette technique n'a pas donné des préparations de haute pureté. Mais, utilisée comme premier stade de purification et suivie d'un fractionnement au sulfate d'ammonium et adsorption sélective sur gel d'alumine, elle a permis à ces auteurs (141) d'obtenir des toxines de haute pureté. Il est également possible d'appliquer le fractionnement au méthanol à des préparations obtenues par un fractionnement initial au sulfate d'ammonium (141).

Les travaux de purification de la toxine diphtérique ainsi que de l'anatoxine par adsorption sélective sont nombreux. On comprend l'importance de cette technique : l'anatoxine adsorbée peut servir de vaccin. Mais cette application pratique exige des conditions difficiles à réaliser : choix d'un agent actif, conditions d'adsorption maximale de l'anatoxine et peu d'impuretés.

Pour la purification de la toxine, on peut suivre deux voies : soit adsorber la toxine et après séparation du précipité, éluer la toxine adsorbée par une solution saline, soit adsorber à partir de préparations toxiques, les diverses impuretés et le minimum de toxine. L'adsorbant peut être ajouté aux solutions toxiques, ou l'on peut opérer dans les conditions nécessaires à sa formation au sein de la solution toxique, par addition d'une solution saline du métal choisi. Les divers sels et hydroxydes de métaux utilisés sont nombreux. Notons parmi les plus importants : l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium, l'hydroxyde de magnésium, les phosphates de calcium, de strontium, de baryum et de zinc, ainsi que les sels de zinc, de fer, de thallium, de cadmium.

La précipitation de la toxine par le sulfate d'aluminium a été étudiée en détail par Tasman et Waasbergen (286) qui ont déterminé l'effet du pH et des concentrations. Eaton (63) a pu isoler des préparations titrant 2 180 UF/mg N par des précipitations répétées avec du chlorure de cadmium et de l'alun. Le chlorure de cadmium ainsi que le charbon ont été utilisés par Linggood (145).

Les techniques d'adsorption seules n'ont pas donné des résultats satisfaisants

pour la purification de la toxine, tandis que combinés à d'autres techniques de purification, telles que le fractionnement par les sels, elles ont permis d'obtenir des préparations de haute pureté. L'hydroxyde d'aluminium a été employé avec succès par divers auteurs, notamment Pappenheimer (204), Lepow et Pillemer (141) et Norlin (188). La technique de préparation de l'hydroxyde d'aluminium a été décrite en détail par Schmidt et ses collaborateurs (276). On trouve une littérature détaillée sur ce sujet dans les publications de van Ramshorst (254) et Norlin (188).

L'ultrafiltration est une technique simple permettant, en même temps, de concentrer de grandes quantités de filtrats de culture du bacille diphtérique et de purifier la toxine. C'est une méthode déjà utilisée en 1915 par Walpole (300), Glenny et Walpole (78), Brown (36), Quigley (237).

Il est possible de préparer des membranes qui laissent passer la toxine et retiennent une partie des impuretés, ainsi que des membranes qui laissent passer une partie des impuretés et pas la toxine. Cette technique de double ultrafiltration a été utilisée par Sierakowski et Zajdel (278) avec des membranes de 3 et 10 % de collodion.

Wadsworth et Wheeler (299) ont obtenu par simple ultrafiltration des préparations titrant 2 200 UF/mg N. La toxine préparée sur milieu synthétique ou semi-synthétique a été d'abord ultrafiltrée sur une membrane à 9,5 % qui retient la toxine, puis ultrafiltrée sur une membrane à 4,5 % qui laisse passer la toxine, et de nouveau concentrée sur une membrane de 9,5 %.

Dans la technique généralement employée, on cherche en premier lieu à concentrer la toxine en utilisant des membranes qui ne laissent pas passer la toxine, pour appliquer ensuite d'autres techniques de purification aux toxines ainsi concentrées. Les membranes se préparent à partir d'une solution de collodion acétique. Des bougies de filtration servant de support sont trempées dans une solution à environ 8 % de concentration, ensuite dans de l'eau pour précipiter la nitrocellulose, opération qui est suivie d'un lavage prolongé pour éliminer complètement l'acide acétique.

La technique de préparation des filtres et un dispositif de l'ultrafiltration adapté à de grandes quantités d'anatoxine diphtérique, est décrit en détail par van Ramshorst (254). L'auteur trouve que les résultats de l'ultrafiltration sont en rapport avec le collodion utilisé pour la préparation des membranes, leur concentration et le rapport entre les volumes avant et après l'ultrafiltration. Dans la technique employée, l'ultrafiltration sert en premier lieu à la concentration des protéines des filtrats de culture, lesquelles sont séparées des produits non protéiques. Une purification des toxines, donc leur séparation des autres protéines non toxiques, se fait toujours avec un mauvais rendement. La toxine, une fois concentrée, est purifiée par d'autres techniques. Des concentrations de collodion à 8 % (Parlodion Mallinckrodt) donnent de très bons résultats et des rendements de 80 à 95 %. L'ultrafiltration a également été utilisée avec succès par d'autres auteurs, entre autres, Pope et Linggood (225).

3. RÉSULTATS DES RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons étudié et mis au point une technique permettant de purifier de grandes quantités de toxine diphtérique et d'obtenir la toxine pure par des voies aussi simples que possible.

Nous avons d'abord essayé de purifier une toxine préparée sur le milieu de Loiseau-Philippe. Ce milieu, à base de viande digérée, s'est montré trop complexe pour l'obtention de préparations de haute pureté et a donc été abandonné. Les résultats détaillés de ces recherches ont déjà été décrits (256).

La toxine préparée sur le milieu à base d'hydrolysate de caséine dans les conditions décrites dans le chapitre II, a été employée avec succès.

La première étape de la purification de la toxine doit être une concentration des filtrats de culture, la purification obtenue à ce stade ayant peu d'importance, le but étant d'obtenir une préparation de toxine concentrée et débarrassée des éléments non protéiques du milieu de culture. Nous avons d'abord concentré la toxine par précipitation avec l'acide métaphosphorique suivant une technique antérieurement décrite (256). Cette méthode s'est montrée excellente pour la concentration des toxines, mais elle a le désavantage de nécessiter une précipitation à -15° et une centrifugation à la même température. Elle a été abandonnée en faveur de l'ultrafiltration, beaucoup moins laborieuse.

L'ultrafiltration a été faite sur des membranes préparées à partir d'une solution acétique de parlodion à concentration 8 %. Des bougies de filtration servent de support. Elles sont d'abord trempées dans de l'acide acétique pur et ensuite dans la solution de parlodion acétique. Après égouttage, on les trempe dans de l'eau; elles sont ensuite longuement lavées. On utilise un dispositif de 6 à 12 bougies reliées entre elles et branchées sur un collecteur de l'ultrafiltrat, réuni lui-même à une pompe à vide. Les bougies trempent dans un bac contenant la toxine dans lequel le niveau constant de liquide est assuré par une alimentation continue en toxine¹.

La toxine concentrée par l'ultrafiltration, désignée comme fraction U, est d'abord dialysée contre du tampon phosphate mono-, dipotassique M/15 + NaCl 0,172 M. pH = 6,8-7,0² et ensuite fractionnée par l'addition d'une solution concentrée de phosphate de potassium ($\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$, 3,5 M. pH = 6,8-7,0) préparée selon Butler et Montgomery (40) et Derrien (57). Le fractionnement par les phosphates a été utilisé par Pope et coll. (226).

On détermine d'avance les quantités de phosphate à ajouter pour recueillir le maximum de toxine pour des concentrations aussi voisines que possible: les rendements varient entre 80 et 95 %. La toxine précipitée titre en général entre 50 et 75 % de concentration en phosphate (fraction P2). La pureté de la toxine recueillie varie selon le milieu de départ et peut aller de 1 100 à 1 700 UF/mg N.

Si la toxine titre de 1 500 à 1 700 UF/mg N, elle est purifiée par adsorption sélective des impuretés; si, au contraire, elle titre environ 1 200 UF/mg N, elle est d'abord fractionnée par une solution saturée de sulfate d'ammonium. Il est de nouveau important de déterminer sur une quantité aliquote le pourcentage de sulfate d'ammonium nécessaire à la précipitation de la toxine. On détermine d'abord la quantité de sulfate à ajouter pour que 5 à 10 % de la toxine précipite; cette fraction est éliminée et on ajoute ensuite la quantité de sulfate nécessaire pour recueillir environ 80 % de la toxine (fraction S2). La toxine est ensuite purifiée par adsorption sélective des impuretés. Nous avons utilisé l'alumine C_γ selon Pappenheimer (206), ou du charbon actif (fraction C_γ ou C). On cherche

1. Nous remercions le Dr Tasman pour les renseignements qu'il a bien voulu nous donner au sujet de l'ultrafiltration.

2. Les autres dialyses sont également faites contre ce tampon.

encore quelles sont les conditions qui permettent d'obtenir une décoloration presque complète des préparations et un rendement qui ne soit pas inférieur à 80 %.

Nous avons aussi employé avec de très bons résultats la technique de Pope (233a).

La toxine ainsi obtenue est précipitée à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium, ensuite dissoute dans de l'eau distillée. La préparation (S3) est légèrement jaune et doit flocculer en moins d'une minute à 45°; elle titre entre 2 000 et 2 400 UF/mg N.

La dernière étape de la purification est la cristallisation de la toxine. On ajoute lentement à la solution de toxine titrant entre 500 et 1 000 UF/ml la quantité de sulfate d'ammonium saturé et neutre nécessaire pour qu'une légère opalescence se forme. On laisse la solution au repos pendant plusieurs heures. Après filtration, on ajoute au filtrat la quantité de sulfate d'ammonium saturé qui augmentera de 2,5 à 5 % la concentration. Pour éviter une augmentation trop brusque de concentration saline, nous avons mis la quantité déterminée de sulfate d'ammonium dans un sac à dialyse. Le sac est mis dans la solution de toxine. Après 24 heures de contact à 0°, on ajoute le contenu du sac à la toxine et la même opération est répétée encore une fois. Le précipité formé contient en général des cristaux et du matériel amorphe.

L'obtention de cristaux sans matériel amorphe nécessite deux et quelquefois même trois à quatre cristallisations de la toxine. Nous avons obtenu deux types de cristaux : a) des cristaux en forme d'obus (Fig. 1, agrandissement 585 x); b) des cristaux en forme d'aiguilles (Fig. 2, agrandissement 845 x).

La toxine ainsi cristallisée titre en général aux environs de 3 000 UF/mg N. Elle floccule très vite et pour déterminer son titre exact, même diluée au niveau 25-75 UF/ml, nous avons été obligés de flocculer à la température ordinaire, sinon tous les tubes situés autour de l'équivalence auraient flocculé en même temps. Les tableaux 4 et 5 montrent les résultats de deux purifications.

TABLEAU 4. Purification de la toxine diphtérique, caractères des diverses fractions

<i>Fraction</i>	<i>UF/ml</i>	<i>mg N/ml</i>	<i>UF/mg N</i>	<i>Rendement</i> %
U	450	1,544	290	100
P2 ^a	820	0,424	1 530	79,5
S3 ^b	650	0,270	2 400	63,5
Cr1 ^c	250	0,0895	2 800	8,6
Cr2 ^d	475	0,157	3 000	11,0
Cr3 ^e	400	0,130	3 080	12,4

^a. Fraction recueillie entre 50 et 75 % de concentration en phosphate.

^b. La fraction P2 a été purifiée par adsorption sélective des impuretés avec du charbon et reprécipitée par du sulfate d'ammonium.

^c. Fraction non cristalline recueillie à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium.

^d. Fraction recueillie entre 50 et 60 % de saturation en sulfate d'ammonium, contenant des cristaux et du matériel amorphe.

^e. Fraction recueillie à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium contenant uniquement des cristaux.

TABLEAU 5. Purification de la toxine diphtérique, caractères des diverses fractions

<i>Fraction</i>	<i>UF/ml</i>	<i>UF/mg N</i>	<i>Rendement %</i>	<i>Observations</i>
U	500	194 1 020 N.P.	100	
P 1	80	89	3,2	Fraction 0-50 %
<u>P 2</u>	1 000	1 150	95	Fraction 50-75 %
S 1	150	651	5,7	Fraction 0-45 %
<u>S 2</u>	1 250	1 925	83,5	Fraction 45-60 %
<u>S 3</u>	1 125	1 990	69,5	
Cr 1	300	1 430	5,5	Fraction 0-50 % N. Cr
<u>Cr 2</u>	1 000	2 350	27,2	Fraction 50-55 % Cr + A
<u>Cr 3</u>	450	2 500	20	Fraction 50-60 % Cr + A
Cr 4	75	1 070	5,9	Fraction 60 % - sat. N. Cr
Cr 5	262,5	2 150	6,1	Fraction 0-50 % N. Cr
<u>Cr 6</u>	700	2 940	29	Fraction 50-60 % Cr + A
Cr 7	100	1 290	1,65	Fraction 60 % - sat. N. Cr
Cr 8	750	3 000	16,6	Fraction 50-56,5 % Cr
Cr 9	325	2 580	6,35	Fraction 56,5-61,5 % Cr + A

Les fractions soulignées ont été purifiées. Les rendements sont calculés par rapport à la fraction U. N.P. : azote protéique; sans indication : azote total. N.Cr : non cristallin; Cr : cristaux. A : matériel amorphe.



FIGURE 1. Toxine diphtérique cristallisée en forme d'obus, agrandissement 585 $\times$.

4. CHROMATOGRAPHIE DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE SUR BRUSHITE

Nous avons également purifié la toxine par chromatographie sur phosphate de calcium. La séparation des protéines par chromatographie sur colonnes de phosphate de calcium (brushite) a été décrite par Tiselius (293).

Le gel de phosphate de calcium est préparé par précipitation à la température ordinaire d'une solution de chlorure de calcium 0,5 M avec une solution de phosphate disodique 0,5 M, suivi de lavages successifs à l'eau distillée ou au tampon utilisé en premier lieu sur la colonne. La solution protéique est dialysée contre ce tampon, en général une solution de phosphate disodique 0,005 ou 0,01 M. Le développement des diverses zones se fait avec des solutions salines de concentrations de plus en plus élevées.

Parmi les diverses préparations étudiées, nous citerons la sérum-albumine humaine qui a été séparée en deux ou même trois composants. Nous avons appliqué cette technique de séparation de protéines à la purification de la toxine diphtérique et nous avons pu isoler la toxine pure à partir de préparations contenant encore diverses impuretés. Le gel, une fois lavé, est versé dans une colonne de 2 cm de diamètre sur une hauteur de 20 cm et soutenu par de la laine de verre. Le liquide d'élution qui traverse la colonne sous une pression d'environ 0,5 à 1 kg, est

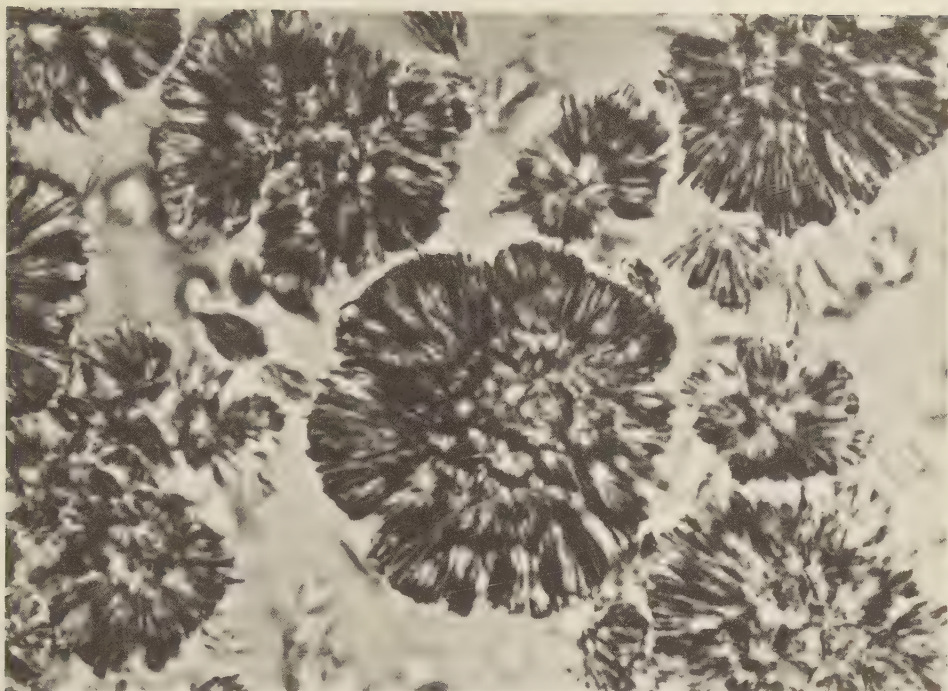


FIGURE 2. Toxine diphtérique en forme d'aiguilles, agrandissement 845 $\times$.

recueilli en quantités de 10 ml dans un collecteur de fractions. La préparation de toxine a été dialysée contre du bicarbonate de sodium à 1 pour 1 000.

Nous avons étudié la chromatographie et l'obtention de la toxine pure à partir de préparations de pureté moyenne, de 1 500 à 2 000 UF/mg N et de pureté plus élevée : de 2 000 à 2 900 UF/mg N.

L'élution des diverses fractions a d'abord été étudiée avec une solution de phosphate de potassium pH = 6,8-7,0, de force ionique croissante. On a calculé les concentrations de phosphate qui éluent les diverses fractions, concentrations ensuite directement employées pour l'obtention de ces fractions. L'augmentation continue de la concentration de phosphate se fait sous agitation magnétique dans un réservoir de volume constant dans lequel arrive une solution concentrée et d'où repart la solution d'élution.

La concentration saline se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$2,303 \log \frac{X}{X-x} = \frac{v}{V} \quad (3)$$

x est la concentration dans le réservoir quand un volume v est passé sur la colonne. X est la concentration de la solution stock. V le volume du réservoir.

Nous avons étudié plusieurs systèmes pour obtenir ces mélanges. Le plus simple semble l'utilisation d'une pompe assurant en même temps l'arrivée et le départ

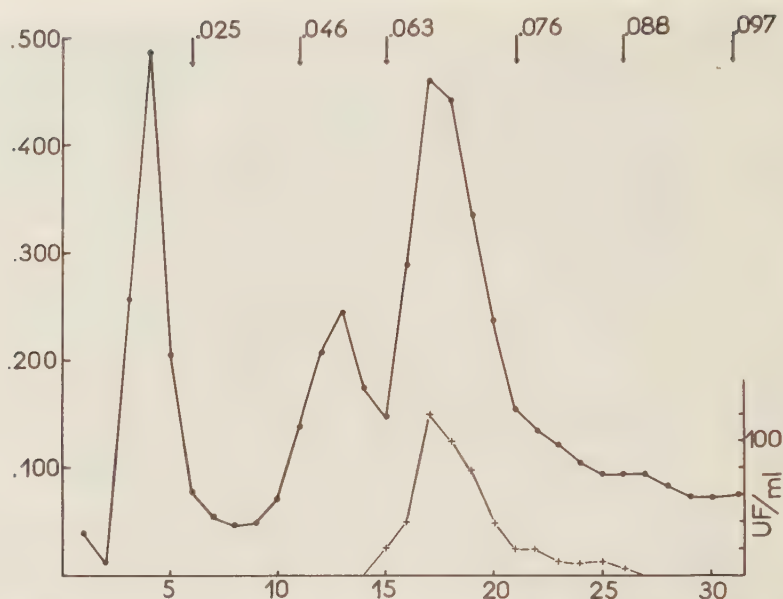


FIGURE 3. Chromatographie sur brushite de 15 ml de toxine diphtérique à 330 UF/ml et 2 050 UF/mg N. Développement avec une solution de phosphate disodique de concentration croissante. Fractions recueillies en quantités de 10 ml.

Abcisse: N° des tubes. Ordonnée: densité optique et UF/ml. Les chiffres avec flèche indiquent les concentrations en phosphate calculées.

Tube 4	0,071 mg N/ml	ne floccule pas	
Tube 13	0,0211 »	ne floccule pas	
Tube 17	0,054 »	3 000 UF/mg N	Rend. 24 %
Tube 18	0,055 »	2 460 »	» 20 %
Tube 19	0,0422 »	2 550 »	» 16 %
			Total 96 %

d'un volume égal dans le réservoir, ceci à l'aide de tubes en caoutchouc reliés d'une part à la solution concentrée et d'autre part à la colonne. A l'aide d'un manomètre, on règle la pression pour que la quantité de liquide sur la colonne, une fois « tassée » reste constante et d'une hauteur de 3 à 5 cm. La concentration en protéines dans les fractions recueillies se fait par la détermination de la densité optique des solutions à 2800 Å; la concentration en toxine est déterminée par floculation.

Nous avons d'abord essayé de faire des chromatographies avec des concentrations croissantes d'une solution de phosphate mono-dipotassique pH = 6,8. Diverses impuretés s'éluent avant la toxine, mais la toxine recueillie de cette façon était trop dispersée en plusieurs tubes et de titre flocculant par ml, par conséquent trop faible. La même expérience faite avec une solution de phosphate disodique montre que l'élution de la toxine se fait dans une zone beaucoup plus serrée (figure 3). Nous avons donc combiné les deux techniques, d'abord éluer la plus grande partie des

TABLEAU 6. Chromatographie sur brushite de 9 500 UF de toxine à 2 850 UF/mg N
(volume des fractions recueillies : 10 ml)

<i>Tubes</i>	<i>Concen- tration phosphate</i>	δ 2 800 A°	UF/ml	UF/mg N	<i>Rendement %</i>	<i>Nombre d'anneaux</i>
1	Toxine	52				0
2	Eau	0				0
	de dialyse					
3	0,01 M K/K ₂	0				0
4	0,01 M K/K ₂	25				0
5	0,01 M K/K ₂	20				0
6	fin 0,01 M	147				0
	début 0,02 M					
7	0,02 M K/K ₂	195				0
8	0,02 M K/K ₂	158				0
9	0,02 M K/K ₂	136				0
10	fin 0,02 M	105				0
	début 0,03 M					
11	0,03 M K/K ₂	105				0
12	0,03 M K/K ₂	102				0
13	fin 0,03 M	77				trace
	début 0,04 M					
14	0,04 M K/K ₂	29				trace
15	0,04 M K/K ₂	83				1
16	0,04 M K/K ₂	90				1
17	0,04 M K/K ₂	83				2
18	fin 0,04 M	72				2
	début 0,05 M					
19	0,05 M K/K ₂	57				1
20	0,05 M K/K ₂	53				trace
21	0,05 M K/K ₂	2				0
22	fin 0,05 M	36				0
	début 0,07 M					
23	0,07 M Na ₂	88				2
24	0,07 M Na ₂	84				1
25	0,07 M Na ₂	75				1
26	0,07 M Na ₂	60				1
27	0,07 M Na ₂	50				3
28	0,07 M Na ₂	196				3
29	0,07 M Na ₂	193	24		2,5	3
30	0,07 M Na ₂	—	—		—	—
31	0,07 M Na ₂	213	72		7,6	2
32	0,07 M Na ₂	250	108	3 000	11,4	1
33	0,07 M Na ₂	436	204	3 160	21,5	1
34	0,07 M Na ₂	255	120		12,6	1
35	0,07 M Na ₂	115	60		6,3	2
36	0,07 M Na ₂	23				3
37	0,07 M Na ₂	60				2
38	0,07 M Na ₂	35				0
39	0,07 M Na ₂	16				0
40	0,07 M Na ₂	21				0

impuretés avec des solutions de phosphate mono-dipotassique et ensuite la toxine avec une solution de phosphate disodique. Le tableau 6 donne les résultats d'une chromatographie effectuée dans ces conditions.

Pour des préparations courantes, nous utilisons la technique suivante. Une préparation de toxine de pureté 2 000 UF/mg N ou plus élevée, est dialysée contre une solution de bicarbonate de sodium à 0,05 %. Sur une colonne de phosphate ci-dessus décrite, sont adsorbées environ 8 000 UF.

On développe d'abord par 150 ml une solution de phosphate mono-dipotassique 0,03 M, pH = 6,8 et ensuite par 100 ml la même solution 0,04 M. La toxine est éluée par une solution de phosphate disodique 0,07 M, pH = 8,2 et recueillie en fractions de 10 ml. L'optimum de densité optique de la dernière fraction, déterminée au spectrophotomètre à 2 800 Å, correspond au tube contenant la plus grande quantité de toxine. Il a été également possible de cristalliser la toxine purifiée par cette technique.

La chromatographie de toxines de pureté inférieure à 2 000 UF/mg N a donné de moins bons résultats, de nombreuses impuretés étant éluées en même temps que la toxine. La figure 4 représente trois chromatographies successives de la même préparation de toxine (abscisse : n° des tubes; ordonnée : densité optique et unités

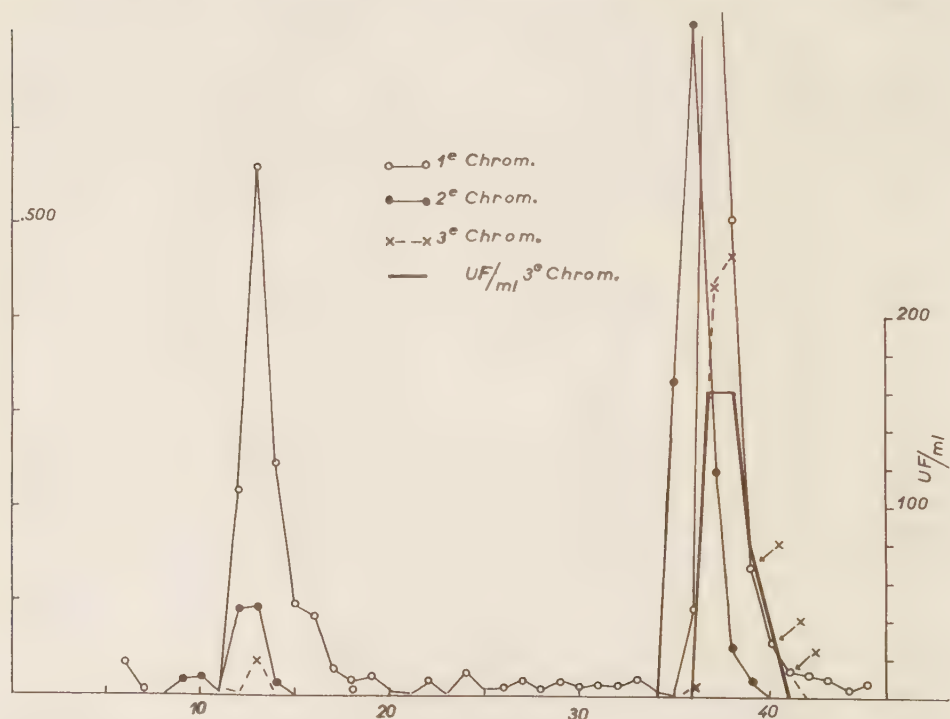


FIGURE 4. Trois chromatographies successives de la même préparation de toxine diphtérique. Les tubes contenant la toxine (34 à 41) ont été réunis et chromatographiés à nouveau après dialyse. Abscisse : n° des tubes; ordonnée : densité optique et unités de floculation par ml. Volume des fractions recueillies 10 ml.

de floculation par ml). On voit que celle-ci se retrouve toujours dans les mêmes fractions. Le tableau 7 donne les résultats de la purification d'une toxine brute par les techniques habituelles suivies de chromatographie.

TABLEAU 7. Purification de la toxine diphtérique, caractères des diverses fractions

<i>Fraction</i>	UF/ml	N mg/ml	UF/mg N	<i>Rendement</i> %
1 ^a	48		1 100 P.N.	
U	1 440	0,960	1 500 P.N.	100
P2 ^b	900	0,535	1 680 P.N.	88,5
S2 ^c	840	0,331	2 540	55
Chr : Tube 32 .	108	0,0425	2 540	7,05
Chr : Tube 33 .	204	0,0710	2 880	13,4
Chr : Tube 34 .	120	0,0382	3 140	7,9

^a. Filtrat de culture.

^b. Fraction recueillie entre 50 et 75 % de concentration en phosphate.

^c. Fraction recueillie entre 45 et 56 % de saturation en sulfate d'ammonium.

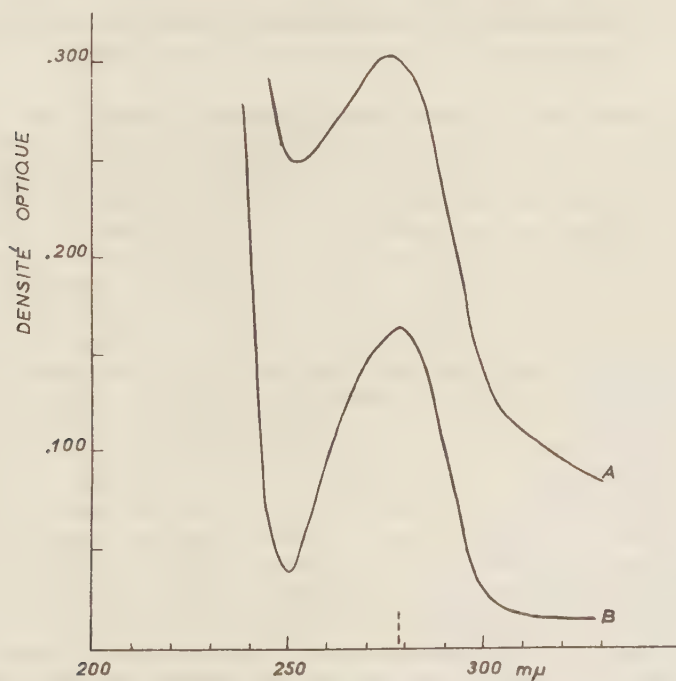


FIGURE 5. Spectres d'absorption de la toxine diphtérique brute à 22,5 UF/ml (A) et la toxine diphtérique pure à 70 UF/ml (B).

5. CARACTÈRES DE LA TOXINE PURE

Une solution de toxine purifiée suivant les techniques décrites et titrant 1 000 à 2 500 UF/ml est très légèrement jaune.

Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet de la toxine cristallisée à 70 UF/ml (B) d'un ultrafiltrat brut de culture à 22,5 UF/ml (A) sont représentés sur la figure 5.

Par la technique de double diffusion en gélose contre un sérum aussi complexe que possible, elle donne une ligne de précipitation; la figure 8 montre la diminution du nombre de lignes au cours d'une purification et la figure 7 les résultats d'une préparation de toxine brute et cristalline, testée à diverses concentrations.

Par unité de floculation, la toxine contient environ 200 000 Doses Minima Réactives (D.M.R.) déterminées sur lapin et environ 30 doses Minima Mortelles (D.M.M.) déterminées sur des cobayes de 250 g (injections par voie intramusculaire).

La toxine pure est homogène à l'ultracentrifugation. Nos déterminations de la constante de sédimentation et de diffusion ont donné des valeurs légèrement inférieures à celles trouvées par Pappenheimer *et al.* (157^a, 217), les expériences sont en cours et feront l'objet d'une publication ultérieure.

6. PRÉPARATION DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE ADSORBÉE SUR PHOSPHATE DE CALCIUM

La toxine est transformée en dérivé atoxique (anatoxine) sous l'action combinée du formol et de la chaleur. Elle est d'abord dialysée contre une solution de bicarbonate de sodium à 0,1 %. Après dialyse, on ajoute la quantité de formol neutre nécessaire pour obtenir une concentration de 2 pour 1 000. La toxine reste à 37° jusqu'à détoxification complète (contrôle par voie intradermique sur lapin et par injection de la solution non diluée au cobaye). Une fois détoxifiée, la préparation est dialysée contre une solution de phosphate disodique 0,07 M et ensuite filtrée sur Seitz.

Les résultats de chromatographie sur brushite nous ont fourni des renseignements permettant de préparer une anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium, destinée à la vaccination et l'hyperimmunisation. Nous avons vu que la toxine est complètement adsorbée à partir de faibles concentrations de phosphate. Un précipité de phosphate de calcium se formant au sein d'une solution de toxine nous a semblé la voie indiquée pour la préparation d'un tel vaccin. Le précipité se forme en ajoutant à la toxine dialysée contre du phosphate disodique et ensuite filtrée une solution stérile de chlorure de calcium dans les conditions optimales.

Une fois les conditions d'adsorption déterminées (quantités de chlorure de calcium à ajouter à la préparation d'anatoxine), le procédé devient simple et reproductible. Certains de nos chevaux ont été hyperimmunisés avec cette anatoxine adsorbée (voir chapitre V). Le pouvoir vaccinant fait l'objet d'une étude détaillée.

Les résultats trouvés jusqu'ici ont montré que l'immunité obtenue avec, comme support, le phosphate de calcium préparé dans les conditions que nous avons mises au point, est égale ou supérieure à celle obtenue avec des adjuvants habituels tels l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium, etc. Le phosphate de calcium

peut naturellement être employé dans les mêmes conditions comme adjuvant pour d'autres antigènes, ainsi que pour la préparation de vaccins mixtes.

Préparation du vaccin.

Solution 1 : 25 g de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O dans un volume final de 1 litre. Merthiolate : 1/10 000.

Solution 2 : 10,2 g de Cl_2Ca , 2 H_2O dans un volume final de 1 litre. Merthiolate : 1/10 000.

Les deux solutions sont stérilisées à l'autoclave. On doit les mélanger à volume égal, ce qui abaisse le pH à environ 5,5. On détermine la quantité de soude normale stérile nécessaire pour ramener le pH à 6,8.

Une solution concentrée d'anatoxine diphtérique est longuement dialysée contre la solution 1 et filtrée sur Seitz. On lave le filtre avec la solution 1 avant de filtrer l'anatoxine.

L'anatoxine filtrée est diluée avec la solution stérile de phosphate disodique afin d'obtenir une solution à 60 UF/ml; on ajoute sous agitation le même volume de la solution de chlorure de calcium, puis la quantité de soude afin d'obtenir un pH = 6,8. On laisse reposer ce mélange pendant une nuit. Un échantillon du mélange est centrifugé. Le précipité est mis en contact avec une solution de citrate de sodium à 5 %. Le surnageant ne doit plus contenir d'anatoxine libre, tandis qu'on doit retrouver la quantité totale dans l'éluat du précipité (test par floculation).

Exemple.

A 40 ml d'anatoxine dialysée et filtrée titrant 150 UF/ml, ont d'abord été ajoutés 60 ml de la solution stérile de phosphate et ensuite, sous agitation, 100 ml de la solution stérile de chlorure de calcium. Le pH est ajusté à 6,8 avec de la soude normale stérile. On a laissé le mélange au repos. Un échantillon de l'anatoxine adsorbée est centrifugé, le surnageant ne contient plus d'anatoxine libre. Le précipité est mélangé avec le même volume de la solution de citrate de sodium et, après centrifugation, la totalité d'anatoxine (30 UF/ml) est retrouvée dans le surnageant. L'élution de l'anatoxine avec la solution de citrate permet donc de déterminer la quantité de toxine adsorbée. Le vaccin ainsi préparé contient environ 4,74 mg de phosphate de calcium par ml. Pour préparer des solutions plus concentrées en anatoxine adsorbée, nous avons laissé le précipité se déposer et enlevé ensuite une partie du surnageant clair.

7. RÉSUMÉ

La purification de la toxine diphtérique a été décrite. La toxine pure a été obtenue sous forme cristallisée. Deux techniques de purification ont été employées : la première comprend l'application des méthodes habituelles de purification de protéines à la toxine diphtérique et permet de purifier de grandes quantités de toxine. La deuxième technique de purification de la toxine est l'application d'une technique récente, la chromatographie sur brushite des protéines. La technique de préparation d'un vaccin, l'anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate de calcium, a été décrite. Les caractères de la toxine pure ont été déterminés.

Analyses immunologiques par des techniques de diffusion en gélose

1. INTRODUCTION

L'analyse d'un mélange de protéines a toujours été une tâche difficile. Si l'on se trouve en présence d'une protéine ayant une activité biologique semblable à celle des diverses toxines bactériennes, son dépistage sera chose aisée, même si elle n'est présente qu'en quantités infimes. Mais ceci ne nous renseigne pas sur la nature des autres protéines présentes dans ces préparations. S'il s'agit de mélanges dont l'activité biologique est difficile à mettre en évidence, tel un mélange d' α -globulines isolé par voie physico-chimique, le problème devient tout de suite beaucoup plus compliqué, et c'est récemment qu'on a pu démontrer l'existence des cinq α -2-globulines du sérum humain.

Les méthodes chimiques et physico-chimiques, telles les précipitations par les sels neutres, l'alcool et d'autres solvants organiques, ainsi que les techniques souvent utilisées dans la purification, comme l'adsorption sélective et la chromatographie, peuvent nous fournir des fractions bien définies, mais qui sont souvent loin d'être pures. Dans le sérum sanguin, on distingue, par exemple, d'après leur solubilité, les fractions euglobulines, pseudoglobulines, et albumines, fractions qui sont en réalité très complexes.

Des techniques physiques, comme l'électrophorèse et l'ultra-centrifugation, permettent de distinguer divers constituants d'après leur mobilité électrophorétique et leur poids moléculaire, mais il reste difficile à dire si ces fractions sont, oui ou non, des mélanges de divers composants. Des méthodes immunologiques classiques nous renseignent facilement sur la présence de certaines protéines. Citons les tests à l'anneau, la floculation, mais ils ne nous disent pas s'il s'agit d'une protéine pure ou d'un mélange. L'adsorption de certains anticorps peut donner des renseignements supplémentaires, mais cette application reste tout de même limitée.

L'introduction par Oudin (201) de la méthode de diffusion simple en milieu gélifié, suivie de la mise au point des diverses techniques de précipitation spécifique en gélose au cours de ces dernières années, nous a fourni un moyen simple et sensible pour analyser des protéines. Ce sont la vitesse de diffusion et l'optimum

de la réaction antigène-anticorps qui permettent d'analyser des mélanges protéiques et de mettre en évidence les molécules avec la même spécificité immunologique. L'incorporation des constituants dans la gélose permet d'éviter l'effet de la pesanteur et de l'agitation mécanique.

On peut distinguer quatre techniques : a) la diffusion simple en tube, technique de Oudin; b) la double diffusion en tube, technique de Oakley et Fulthorpe; c) la double diffusion en boîte de Pétri, technique de Ouchterlony; d) l'immuno-électrophorèse, technique de Grabar et Williams, qui comporte, outre les 2 variantes déjà citées, une troisième, la mobilité électrophorétique.

Le phénomène de précipitation spécifique en gel est connu depuis longtemps, et les divers auteurs sont bien d'accord pour l'imputer à la réaction du système antigène-anticorps. Cette technique a été utilisée pour différencier les diverses espèces microbiennes. La formation de divers anneaux a été observée à plusieurs reprises, mais, fait étonnant, la plupart des chercheurs ne voient pas l'importance de ce phénomène ou l'interprètent comme étant des anneaux de Liesegang, sans essayer de trouver une autre explication. Le premier à démontrer que ces anneaux sont dus à des réactions immunologiquement spécifiques a été Oudin (201). Un seul antigène donne seulement une zone ou une ligne de précipitation, alors que plusieurs systèmes antigène-anticorps en donnent diverses, chacune étant la résultante de la réaction d'un système antigène-anticorps.

2. TECHNIQUE DE SIMPLE DIFFUSION EN GÉLOSE

La technique de Oudin, celle de la simple diffusion, a été décrite en détail (201) et nous en donnerons seulement les grandes lignes.

L'antigène non gélosé diffuse dans un tube de faible diamètre dans une couche d'antisérum gélosé. Des zones de précipitation spécifique se forment, chaque système antigène-anticorps donnant naissance à une zone. L'antisérum et la gélose sont mélangés à une température d'environ 47°; la concentration finale en gélose est de 0,3 %, on ajoute 0,85 % de NaCl. Le diamètre des tubes peut varier entre 1,5 et 5 mm. La solution gélose + sérum est répartie avec une pipette Pasteur sur une hauteur de 30 à 40 mm. On laisse ensuite les tubes à la température de l'expérience, en général 37° C, après équilibre de température, on ajoute sur une hauteur de 10 à 40 mm, la solution antigénique, également à la même température. La solution antigénique est aussi concentrée que possible.

Des observations peuvent déjà être faites après 24 heures; en général, on laisse les tubes au minimum 7 jours à la température de l'expérience. Les changements de température pendant l'expérience peuvent donner, comme l'a démontré Oudin, des bandes de précipitation non spécifiques. On doit donc éviter des changements de température jusqu'à la fin de l'expérience.

La formation d'un précipité dépend des concentrations relatives de l'antigène et de l'anticorps à chaque point du gel. Les courbes de précipitation quantitative traitées en détail dans le chapitre VI nous renseignent à ce sujet.

Il existe deux types de réaction :

Dans les réactions de type lapin, le complexe antigène-anticorps est soluble dans un excès d'antigène et insoluble dans un excès d'anticorps, tandis que dans les réactions de type cheval, le précipité est soluble dans un excès d'antigène et dans

un excès d'anticorps. Dans les deux cas, le maximum du précipité est obtenu pour un léger excès d'antigène. Dans le système cheval, ce point se trouve à la fin de la zone rectiligne de la courbe, et pour le système lapin, dans la région d'excès d'antigène (voir fig. 22).

Deux autres facteurs importants dans la formation des précipités sont les concentrations absolues des deux constituants et le temps de réaction nécessaire à la formation des précipités. Les concentrations de l'antigène et de l'anticorps, même à l'équivalence, doivent dépasser un certain minimum pour pouvoir donner un précipité visible. Cette concentration a été calculée par Ouchterlony (196) pour le système toxine-antitoxine diphtérique; elle est d'environ 0,35 UF/ml.

Dans les réactions antigène-anticorps, on peut distinguer deux stades : la combinaison et la précipitation. On considère que la combinaison est immédiate, tandis que la précipitation dépend de la concentration absolue du complexe à l'équivalence. La relation temps-concentration a été étudiée par Hooker et Boyd (114) pour les réactions de floculation; ils trouvent une relation linéaire entre les logarithmes des concentrations et des vitesses de floculation.

Un système antigène-anticorps donne une seule zone de précipitation tandis que plusieurs systèmes réagissent indépendamment les uns des autres. Dans les réactions croisées, plusieurs antigènes de constitution voisine peuvent réagir avec le même antisérum; la formation des zones et des lignes dépend dans ce cas de la concentration relative entre ces antigènes.

Nous considérons que la présence de la gélose n'a pas d'influence sur la formation des précipités et que les résultats seront les mêmes qu'en milieu liquide. A l'interface des couches antigène-anticorps, la concentration de l'antigène change rapidement; si la concentration de l'antigène est très élevée par rapport à l'anticorps, il n'y aura pas de précipité à ce point, parce que le changement de concentration sera plus rapide que le temps de précipitation, et il y aura excès d'antigène et donc des complexes solubles, avant que le précipité ne se soit formé.

Considérons les réactions après un certain temps de diffusion. La concentration de l'antigène dans la gélose diminue progressivement à partir de l'interface. A un certain endroit, l'antigène ou des complexes antigènes-anticorps diffusant vers le bas, entrent en contact avec l'anticorps libre; il y a donc précipitation et ceci continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'anticorps libre. La quantité de précipité devient maximale, ensuite il y a dissolution du précipité et le front se déplace. Nous voyons qu'il doit exister un front très net du complexe qui se déplace vers le bas du tube et autant de fronts qu'il y a de systèmes antigène-anticorps. Ce sont donc surtout des concentrations relatives des antigènes et des anticorps ainsi que la constante de diffusion des antigènes, qui déterminent la séparation des fronts.

Le maximum de précipité se trouve en général juste après le front, ensuite il y a diminution suivie de l'absence du précipité, le complexe antigène-anticorps est complètement dissous dans l'excès d'antigène. Si au contraire, on laisse diffuser un antisérum de lapin dans un gel qui contient l'antigène spécifique, ce front n'existera pas, mais il y aura formation d'un précipité qui augmentera vers le haut du tube; le précipité ne sera pas soluble dans un excès d'anticorps, et c'est la raison pour laquelle on emploie le procédé inverse.

La quantité de précipité formé dépend seulement de la concentration de l'anticorps spécifique dans la couche gélosée; avec une quantité d'antisérum fixe et des

quantités variables d'antigène, le précipité formé est le même. Une quantité plus ou moins concentrée d'anticorps spécifique donnera un front plus ou moins dense.

Oudin a démontré que si deux antigènes ou plus donnent des réactions croisées, il ne peuvent pas réagir l'un indépendamment de l'autre. L'antigène qui précipite la quantité plus faible d'anticorps donnera la zone la plus basse. La formation de cette zone dépend également de l'autre antigène et vice-versa.

La technique de simple diffusion en gel permet de calculer la constante de diffusion des antigènes employés, comme l'ont démontré Becker *et al.* (15). Si la concentration de l'antigène est très élevée par rapport à la concentration de l'anticorps, on peut considérer que le déplacement du front est celui d'une concentration fixe, comme c'est le cas dans une diffusion libre; la diffusion se fait alors suivant la formule de Fick :

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)_x = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}\right)_t \quad (4)$$

C étant la concentration à une distance x , après un temps t ; D étant la constante de diffusion.

L'intégration de cette formule donne la relation suivante :

$$C = C_0 \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy\right), y = \frac{x}{2\sqrt{Dt}}. \quad (5)$$

C_0 étant la concentration initiale; C la concentration à une distance x de l'interface solution-solvant après un temps t .

Il y a donc une relation linéaire entre la distance x et la racine carrée du temps. Le déplacement du front est proportionnel à $\sqrt{t}$. Le rapport antigène/ anticorps au maximum de la courbe de précipitation étant R, la concentration de l'antigène dans le front sera de R.Ac. La concentration de l'anticorps (Ac) est connue et on peut calculer Ag (concentration de l'antigène) à l'aide des courbes de précipitation quantitative.

La quantité totale de précipité dans le front $R\text{Ac} + \text{Ac}$ ne dépend pas de la concentration de l'antigène. Nous avons donc :

$$C = R\text{Ac} = \text{Ago} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy\right); \quad (6)$$

$$y = \frac{x}{2\sqrt{Dt}} = \frac{K}{2\sqrt{D}}; K = \frac{x}{\sqrt{t}}.$$

avec les limitations suivantes : a) la concentration de l'antigène est élevée par rapport à la concentration de l'anticorps; b) l'anticorps ne diffuse pas; c) la formation du précipité est négligée; d) la concentration de l'antigène à l'interface ne change pas; e) la présence de la gélose n'a pas d'influence sur la diffusion.

D'après cette formule, la migration de la bande sera proportionnelle à la concentration de l'antigène et inversement proportionnelle à la concentration de l'anticorps. Si la concentration de l'antigène est trop faible, il y aura un précipité dans la couche de l'antigène; de même, si les concentrations sont les mêmes, le précipité se formera à l'interface et sera immobile. La pente de la droite obtenue dans la représentation graphique de x en fonction de $\sqrt{t}$ nous donne la valeur de K et il est possible de calculer D.

Une autre formule appliquée à ce problème par Becker *et al.* (15) est celle que Mitchison et Spicer (173) ont utilisée pour calculer la diffusion de la streptomycine :

$$\log A_{go} = \log A_c R \sqrt{\pi} + \frac{K^2}{9,210 D} \quad (7)$$

On trace la droite représentant K^2 en fonction du logarithme des différentes concentrations de A_g . La pente T de cette droite permet de calculer la constante de diffusion :

$$D = \frac{1}{9,210 T} \quad (8)$$

Les constantes de diffusion de l'ovalbumine, de la sérum-albumine bovine et de l'albumine de cheval ont été déterminées : les valeurs obtenues diffèrent peu de celles connues. Cette technique est utilisée par Rubenstein pour faire une estimation de la concentration d'un antigène. Une théorie sur la diffusion en gélose a été également développée par Augustin *et al.* (9).

3. TECHNIQUES DE DOUBLE DIFFUSION EN GÉLOSE

Dans les techniques de double diffusion, il y a entre l'antigène et l'anticorps gélifiés et ou non gélifiés, une couche qui contient uniquement de la gélose. L'antigène et l'anticorps diffusent l'un vers l'autre. Si la concentration des protéines dans les réservoirs ne change pas, nous pouvons considérer que la diffusion se fait dans les conditions dont il a déjà été question ci-dessus.

Il y aura, à nouveau, formation d'un précipité si les systèmes antigène-anticorps qui se rencontrent sont : a) à l'équivalence; b) au-dessus d'une certaine concentration minima. Le point de rencontre de l'antigène et de l'anticorps dépend de nouveau de leur constante de diffusion et de leur concentration initiale. Pour des concentrations égales d'antigène et d'anticorps, la distance entre ce point et les réservoirs sera proportionnelle aux racines carrées des constantes de diffusion. Le temps nécessaire à la formation du précipité sera d'autant plus court que leur concentration initiale sera plus élevée.

Chaque système antigène-anticorps donne donc naissance à une ligne de précipitation spécifique, ce qui ne veut pas dire que chaque ligne soit seulement la résultante d'un système, puisqu'une ligne visible peut être en réalité composée de plusieurs lignes qui se confondent en donnant ainsi l'impression de n'en être qu'une seule. Ce sera le cas quand les proportions des antigènes ayant des coefficients de diffusion égaux ou voisins, seront égales ou voisines de celles des anticorps correspondants. Ce phénomène a fait l'objet d'une étude détaillée de Kaminski (124).

Pour un excès d'antigène, la ligne qui se forme sera d'abord nette mais se déplacera ensuite vers le réservoir qui contient l'anticorps, le premier précipité formé étant soluble dans un excès d'antigène. Dans le cas contraire, le front se déplacera vers le réservoir de l'antigène. Avec un antisérum de lapin, le précipité sera insoluble dans un excès d'anticorps; il y a formation d'une zone qui s'élargit vers le réservoir de l'antigène. Avec un sérum de cheval, le précipité sera de nouveau soluble dans un excès d'anticorps et il en résulte une bande qui se déplace vers le réservoir de l'antigène.

Dans la technique de Oakley et Fulthorpe (194), on place dans un tube, d'abord une couche de gélose contenant l'antisérum, ensuite une couche qui contient uniquement de la gélose et finalement la solution des antigènes. Les anticorps et les antigènes diffusent donc dans la couche intermédiaire. Des disques se forment à l'endroit où l'antigène et l'anticorps spécifique sont à des concentrations optimales de précipitation. La séparation des disques dépend de la vitesse de diffusion des antigènes et des concentrations respectives des antigènes et des anticorps.

Les auteurs signalent également le déplacement des lignes dû à un excès de l'un des deux réactifs, ainsi que des phénomènes de dédoublement. Ils ont étudié par cette méthode des filtrats de culture du bacille diphtérique, ainsi que ceux du *Cl. Welchii* types A, B, C et D.

Une estimation des titres du sérum par le déplacement de la zone de précipitation spécifique peut être faite. Si l'on ajoute le sérum à tester à la solution d'antigène, la bande se déplace vers la couche contenant l'antigène; le déplacement est comparé à celui que provoque un sérum de titre connu.

Bowen (23) a étudié par cette technique la composition antigénique des préparations de toxine diphtérique purifiée. Diverses antitoxines ont été utilisées. Il y a toujours formation de plusieurs lignes, leur nombre dépend de la toxine ou de l'antitoxine utilisées. On a trouvé le plus grand nombre de lignes avec les fractions qui précipitent les premières par fractionnement aux sels neutres (« low-salt fractions »); les fractions qui précipitent aux concentrations plus élevées (« high salt fractions ») en donnent moins. Les sérums préparés par digestion enzymatique donnent le nombre le moins élevé de lignes. La différence serait due au mode de préparation de ces divers types d'antitoxines et non aux différences existant entre les fractions. Les saignées de début d'immunisation donnent moins de lignes que les saignées finales. Des préparations de pureté élevée donnent moins de lignes que des préparations moins pures.

La technique de double diffusion en boîte de Pétri, mise au point par Ouchterlony (198, 200) a le grand avantage de permettre de comparer entre elles les diverses préparations d'antigène, ainsi que divers antisérums. La boîte de Pétri contient de la gélose concentrée à environ 1,5 %. Un réservoir central contient l'antisérum; à une distance de 1 à 2 cm se trouvent divers autres réservoirs contenant des solutions d'antigène à tester. Pour comparer diverses préparations d'anticorps, on met au milieu la solution antigénique. La figure 6 montre les différentes possibilités de réaction.

Si deux antigènes sont identiques, leurs lignes de précipitation se rejoignent (A); dans le cas contraire, les lignes se croisent (B). Il est donc possible de comparer et d'identifier les antigènes, ainsi que divers antisérums. Comme l'a démontré Ouchterlony, on peut aussi mettre en évidence deux antigènes qui ne sont pas semblables mais que ont une constitution voisine et donnent une réaction croisée; dans ce cas les lignes se rejoignent incomplètement. Une étude par cette technique, de ces antigènes donnant une réaction croisée, telles les globulines des diverses espèces animales, a été faite par Korngold (127).

Il y a diverses possibilités. Un antigène contient, par exemple, deux groupes déterminants A et B, tandis qu'un autre contient seulement de groupe déterminant B. L'antisérum contient des anticorps anti-A et anti-B. L'antisérum réagit dans le premier cas avec A et B, il y a formation d'une ligne de précipitation. Avec l'antigène qui contient seulement B, il y a formation du précipité B - anti-B, mais

les anticorps anti-A ne sont pas combinés et diffusent à travers cette ligne de précipitation, réagissant de nouveau avec A (C). La figure D montre l'image obtenue si l'on compare deux antigènes avec des groupes AB et BC, et l'antisérum contient des anticorps contre ces trois groupes.

Comment distinguer la différence entre des réactions d'identité partielle et des lignes qui se croisent ? Si les antigènes sont différents, la densité des traits diminue d'une façon régulière. Dans le cas contraire, les lignes d'identité partielle se rejoignent dans un premier temps et se croisent après diffusion plus prolongée; les lignes sont beaucoup plus minces à partir du point de jonction, le nombre de systèmes « groupes déterminants-anticorps » diminue brusquement à partir de ce point.

Il est également possible qu'une préparation d'antigènes contienne diverses protéines pouvant donner une réaction croisée avec un antisérum dirigé contre une de ces protéines, par exemple un mélange des globulines de diverses espèces animales et un antisérum préparé à partir de l'une de ces globulines.

L'image obtenue dépend de la concentration des antigènes. Une préparation contenant l'antigène AB et également une autre protéine avec le groupe B en concentration élevée par rapport à AB, donne, comparée à une solution contenant seulement B, l'image E, et comparée à AB, l'image F. G représente l'image de deux préparations qui contiennent toutes deux B en quantité élevée. Si B est présent en concentration peu élevée, l'image E devient celle de C; F et G seront dans ce cas égaux à A. Le système qui diffuse le plus vite, se combine donc avec tous les anticorps disponibles. Les exemples que nous venons de donner sont des conditions extrêmes; en général, elles sont beaucoup moins nettes.

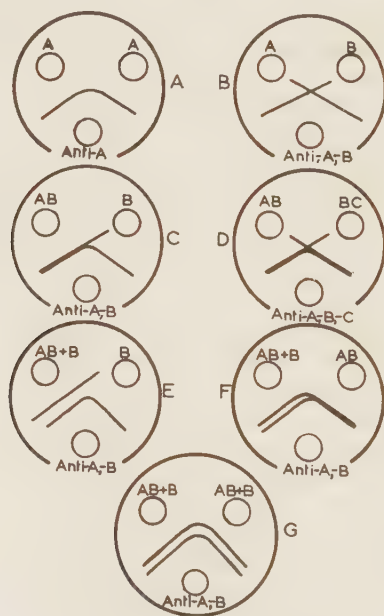


FIGURE 6

Wilson et Pringle (306) ont fait une étude détaillée de ces systèmes. Ils ont comparé la sérum-albumine bovine et des dérivés halogénés avec des anticorps préparés à partir de ces corps.

Ouchterlony (196) applique la formule (5) pour calculer le rapport des constantes de diffusion : $D_{\text{antitoxine}}/D_{\text{toxine}}$. Si la concentration initiale de la toxine est C_T , de l'antitoxine C_{AT} , la concentration minima pour avoir un précipité L , et la distance entre la ligne et les deux centres de diffusion x_{AT} et x_T , cette formule devient

$$L = C_{AT} \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{y_{AT}} e^{-y_{AT}^2} dy_{AT} \right) = C_T \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{y_T} e^{-y_T^2} dy_T \right) \quad (9)$$

$$y_T = \frac{x_T}{2\sqrt{D_T \cdot t}}; \quad y_{AT} = \frac{x_{AT}}{2\sqrt{D_{AT} \cdot t}}.$$

Si l'on a les mêmes concentrations de toxine et d'antitoxine, y_T sera égal à y_{AT} et nous aurons :

$$\frac{D_{AT}}{D_T} = \left(\frac{x_{AT}}{x_T} \right)^2 \quad (10)$$

x_{AT}/x_T est donc indépendant de la valeur absolue des concentrations initiales et indépendant de la distance entre les réservoirs, si les concentrations sont les mêmes. Cette valeur a été déterminée par Ouchterlony pour le système toxine-antitoxine diphtériques. Les distances entre les deux réservoirs ainsi que la concentration de départ étant variables, le rapport trouvé reste le même. Ce rapport donne : $D_{AT}/D_T = 0,56$. Si les concentrations dans les réservoirs ne sont pas les mêmes :

$$\frac{D_{AT}}{D_T} = \left(\frac{y_T \cdot x_{AT}}{y_{AT} \cdot x_T} \right)^2 \quad (11)$$

D_{AT}/D_T peut être calculé si l'on connaît la valeur de L . L ne peut être calculé directement, mais on peut trouver une valeur (0,35 UF/ml) qui, dans une série d'expérience donne le rapport D_{AT}/D_T tel que la déviation standard soit minimale. Les valeurs trouvées pour D_{AT}/D_T par cette méthode (0,55-0,56) ne correspondent pas à celles calculées directement (0,63-0,73).

Ouchterlony pense que la gélose retarde la diffusion des grandes molécules et que ce retard augmente avec leur dimension. Dans la diffusion en gel, la différence entre les dimensions des molécules de la toxine et de l'antitoxine donne des rapports trop bas. L'effet du retardement de très grosses molécules a été observé par Kaminski avec les γ -globulines (124). Le facteur « temps », c'est-à-dire le temps nécessaire à la formation d'un précipité visible, a été également étudié par Ouchterlony (197) pour les réactions en gel.

Il a été démontré qu'il existe dans le système toxine-antitoxine diphtériques une relation linéaire entre le logarithme de la concentration et le logarithme du temps.

Il arrive souvent que les quantités de produits dans les réservoirs ne suffisent pas à former un précipité visible; la concentration minima pour que le précipité à l'équivalence soit visible n'est pas atteinte.

Divers auteurs effectuent dans ce cas une recharge pour augmenter les concentrations de protéines dans ces réservoirs, concentrations qui s'abaissent en 12 h d'environ 25 % (196). L'effet de la recharge a été étudié par Kaminski (123) qui trouve que les recharges faibles ont peu d'effet sur une ligne de précipité formée, tandis que des recharges à fortes doses amènent des déplacements très souvent accompagnés d'irrégularités. Il est préférable de ne pas faire de recharges et d'utiliser au départ des produits aussi concentrés que possible, d'autant plus que les techniques de concentration de protéines sont très perfectionnées (ultrafiltration, précipitation, évaporation en sac de cellophane); les processus de diffusion se feront alors dans les meilleures conditions.

La ligne de précipitation spécifique est une droite si l'antigène et l'anticorps ont des poids moléculaires qui diffèrent peu. Si le poids moléculaire de l'antigène est plus élevé que celui de l'anticorps, la ligne de précipitation spécifique sera courbe et s'infléchira vers le réservoir des antigènes (128).

Ouchterlony (199) a fait l'étude de la composition antigénique de la toxine et de l'anatoxine diphtériques à différents stades de la purification. Dans la toxine brute, il y a au moins encore 7 autres antigènes différents de la toxine. Dans une toxine purifiée à 2 000 UF/mg N, il y a encore 6 antigènes. Des préparations dont l'homogénéité a été contrôlée par l'ultra-centrifugation, contiennent encore 4 antigènes, la toxine et trois autres qu'on retrouve également dans les préparations brutes.

4. L'IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE

Les techniques de précipitation spécifique en gélose, appliquées à des mélanges de plusieurs systèmes antigènes-anticorps, provoquent la formation de multiples lignes ou zones. Leur identification n'est pas facile, sauf dans les cas où l'on possède les échantillons purs des antigènes ou des antisérums contenant un anticorps spécifique.

Grabar et Williams (96, 97, 98, 99, 304, 305) associent à la précipitation spécifique en gélose une autre variante, la mobilité électrophorétique des constituants. Cette mobilité, caractère bien défini des protéines, permet un classement des divers constituants d'un mélange. La réaction de précipitation spécifique révèle ensuite leur présence.

Après électrophorèse en gélose, la diffusion des constituants révélateurs se fait à partir des rigoles, perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique; chaque fois que les antigènes et les anticorps se rencontrent en proportions convenables, il y a formation d'un précipité comme dans la technique d'Ouchterlony. Ces précipités ont la forme d'un arc parabolique. L'endroit où l'arc se rapproche le plus de la rigole correspondant à la concentration la plus élevée du constituant en cause, permet de calculer, par comparaison à des constituants de mobilité connue, sa mobilité électrophorétique. Les quantités soumises à l'analyse sont très petites, en général 0,1 ml.

Grabar et Williams (98), (305) distinguent dans le sérum humain normal 16 à 18 constituants. Entre autres, deux constituants qui migrent plus vite que la sérum-albumine, deux ou trois α -1-globulines, cinq α -2-globulines, trois β -1-glo-

bulines, trois β -2-globulines. La ligne des γ -globulines est très allongée; ces globulines forment un groupe de protéines qui ont la même spécificité antigénique, mais une mobilité électrophorétique hétérogène. L'un des inconvénients de cette technique est la préparation des immun-sérums spécifiques. Il est très difficile d'obtenir, chez le même animal, en quantité élevée, des anticorps contre tous les constituants antigéniques d'un mélange de protéines tel que, par exemple, le sérum normal de cheval.

On se voit donc obligé d'immuniser divers animaux (dans ce cas p. ex. : des lapins) avec le sérum entier, ainsi qu'avec des fractions obtenues par précipitation saline. Les antisérums obtenus sont mélangés dans des proportions déterminées après analyse de chacun d'eux. La technique d'immuno-électrophorèse a déjà été appliquée avec succès dans plusieurs domaines. Une publication récente résume les nombreux résultats obtenus (274).

La technique d'électrophorèse ordinaire en gel a été décrite par Gordon *et al.* (95) et peut se faire dans les mêmes conditions que l'immuno-électrophorèse que nous venons de mentionner. Dans ce cas, il n'y a pas de révélation immunologique et il est même intéressant, dans certains cas, de faire les deux simultanément sur deux plaques différentes.

Des techniques permettant la caractérisation des protéines, lipides, phospholipides et glucides par des réactions colorées, après électrophorèse simple ou immuno-électrophorèse en gel, ont été mises au point par Uriel et Grabar (295). Il est possible de sécher la gélose une fois colorée; on obtient des feuilles minces et transparentes dans lesquelles les taches ou lignes colorées sont très nettement visibles. Des mesures photométriques peuvent être faites sur des feuilles colorées de l'électrophorèse en gélose. L'intérêt de ces techniques est multiple, puisqu'il y a caractérisation électrophorétique, immuno-chimique et chimique des constituants.

5. APPLICATION DES TECHNIQUES DE DIFFUSION EN GÉLOSE AU SYSTÈME TOXINE-ANTITOXINE DIPHTÉRIQUES

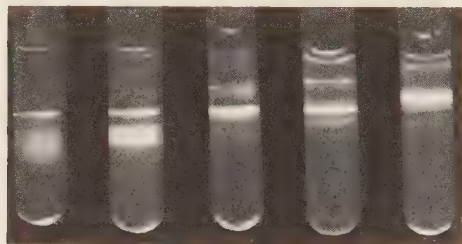
Nous avons suivi la purification de la toxine diphtérique par la technique de Oakley et Fulthorpe et par celle de Ouchterlony. Pour la mise en évidence des divers antigènes présents dans des filtrats de culture du bacille diphtérique, nous nous sommes servis d'un sérum obtenu par hyperimmunisation, pendant quelques mois, de plusieurs chevaux avec la toxine brute. Les saignées finales de ces chevaux ont été mélangées et les anticorps présents ont été purifiés par la technique de digestion pepsique (5). Ce sérum antidiphtérique brut n° 906 donne, testé par la technique de précipitation spécifique en gel contre la toxine brute concentrée M, au moins 15 lignes. D'autre part, ce sérum complexe donne une seule ligne avec des échantillons de la toxine pure titrant 3 000 UF/mg N.

La technique de double diffusion montre la diminution du nombre de lignes pendant la purification de la toxine. Pour mettre en évidence les impuretés dans les échantillons de haute pureté, il est nécessaire de tester les préparations en grand excès de toxine par rapport à la concentration de sérum utilisé. Pour cela, nous avons toujours effectué les expériences avec diverses concentrations de toxine et une concentration fixe de sérum. Le sérum dans la couche gélosée est en général à 100 unités de floculation par ml, tandis que la toxine a été testée à des concen-

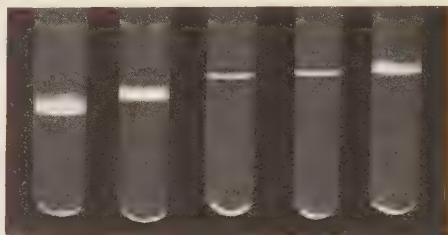
trations comprises entre 25 et 500 unités de floculation par ml. La figure 7 montre les résultats de ces expériences. Une toxine brute, concentrée par précipitation à l'acide métaphosphorique (M), montre, testée contre le sérum 906, plusieurs lignes, tandis que dans la toxine (T) à 3 000 UF/mg N, il n'en reste qu'une seule. Des échantillons de toxine de pureté 2 400 UF/mg N et homogènes à l'ultra-centrifugation, contiennent, outre la toxine, encore au moins sept autres antigènes.

Nous avons également testé des préparations d'anticorps obtenues par digestion pepsique du précipité spécifique formé à l'équivalence de floculation. Cette technique sera traitée en détail dans le chapitre VI; elle permet d'obtenir des préparations qui contiennent comme anticorps, seulement l'antitoxine. Le sérum 1451 (saignée du 82^e jour) a été purifié au moyen de cette technique. Ce sérum contenait avant la digestion, outre l'antitoxine, au moins 4 autres anticorps (pour la description de ce sérum, cf. page 109). La figure 7 montre que cette préparation testée contre la toxine brute donne une seule ligne.

M à : 450 250 100 50 25 T à : 450 250 100 50 25 UF/ml

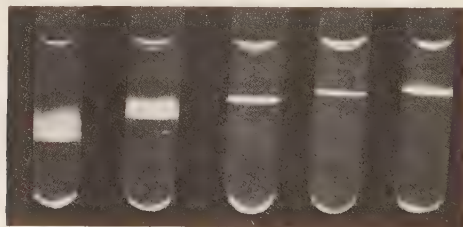


Sérum complexe N° 906 à 100 UF/ml



Sérum complexe N° 906 à 100 UF/ml

M à : 450 250 100 50 25 UF/ml



Sérum 1451 digéré à 100 UF/ml

FIGURE 7. Application de la technique de double diffusion en gélose (technique de Oakley et Fulthorpe) à l'étude de la complexité de diverses préparations de toxine et d'antitoxine diphtérique. M : toxine brute concentrée; T : toxine pure.

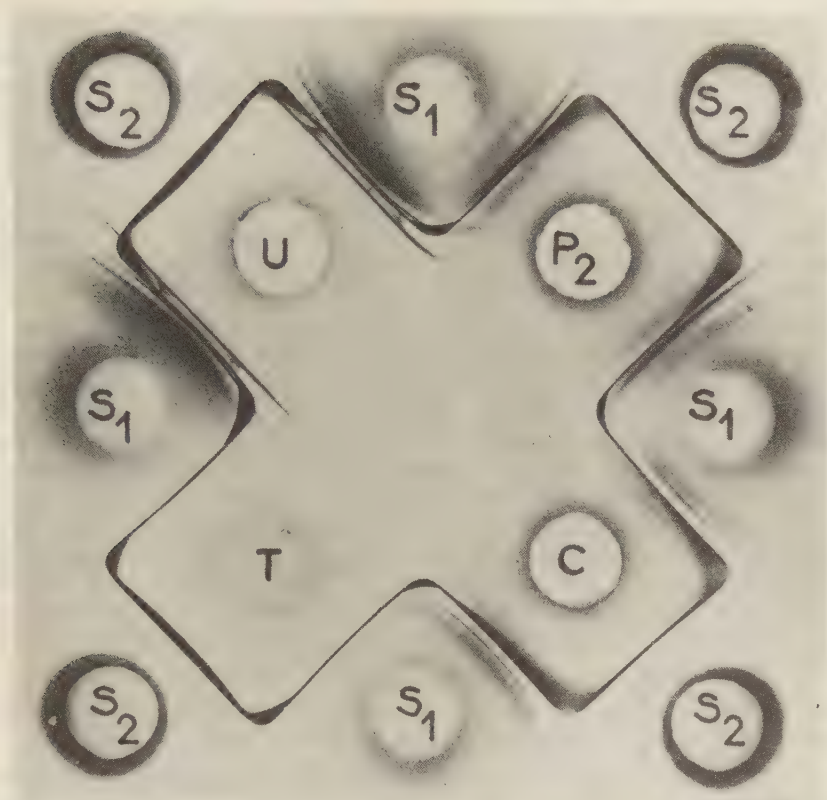


FIGURE 8. Application de la technique de double diffusion en gélose (technique de Ouchterlony modifiée) à l'étude de la complexité de diverses préparations de la toxine et de l'antitoxine diphtériques. (Pour les caractères des diverses préparations testées, voir p. 41.)

La figure 8 montre les résultats obtenus avec la toxine à divers stades de purification testée par la technique de diffusion en plaque contre un sérum complexe (S1) et un sérum contenant uniquement l'antitoxine (S2).

S1: sérum complexe n° 906 contenant de nombreux anticorps antiprotéines diphtériques; S2: sérum contenant uniquement les anticorps antitoxine diphtérique obtenu par digestion du précipité spécifique du sérum 1451 à l'optimum de floculation. U: toxine à 200 UF/mg N; P2: toxine à 1 150 UF/mg N; C: toxine à 2 000 UF/mg N; T: toxine à 3 080 UF/mg N. Toutes les fractions sont à 500 UF/ml. [Dans les réservoirs 0,4 ml de chaque fraction (reproduction photographique grandeur nature)]. La méthode d'obtention de ces fractions est décrite dans le chapitre III.

On voit que le sérum S2 donne une ligne unique avec toutes les préparations de toxine de puretés variables. Testée contre le sérum S1, seule la préparation T

donne une ligne unique de précipitation. Il est possible de dépister dans le système U-S 1, parmi toutes les lignes de précipitation, celle du système toxine-antitoxine à l'aide du système toxine pure T - sérum complexe S 1, ou du système toxine brute U - sérum purifié S 2. Dans les deux cas, il y a une seule ligne de précipitation qui rejoint la ligne de la réaction toxine-antitoxine dans le système complexe S 1 - U.

Les méthodes immunologiques qu'on peut considérer comme les plus sensibles montrent donc que la préparation T contient uniquement la toxine et le sérum S 2 uniquement l'antitoxine anti-diphtérique. La figure 9 montre les résultats de l'électrophorèse en gélose d'un sérum humain normal (SHN) et de la toxine pure (T).

Pour l'étude immuno-électrophorétique de la réaction toxine-antitoxine, nous avons utilisé les préparations suivantes: a) le sérum 906 que nous venons de décrire; b) le sérum 341 bis obtenu par digestion pepsique du précipité spécifique formé par le sérum 341 (saignée du 38^e jour) avec la toxine diphtérique brute concentrée par l'acide métaphosphorique. Le sérum 341 contient, outre l'antitoxine, encore deux anticorps accessoires; la préparation digérée 341 bis ne contient plus ceux-ci et ne réagit qu'avec la toxine purifiée. Cette préparation donne, testée avec la toxine brute (M), une seule zone de précipitation spécifique et titre 700 UF par milligramme d'azote; c) une toxine brute (M) concentrée par précipitation à l'acide métaphosphorique titrant 214 UF/mg N; d) une toxine purifiée (T) titrant 3 000 UF/mg N. Cette toxine ne donne qu'une seule zone de précipitation spécifique en gel avec le sérum 906 dans les conditions que nous venons de préciser.

La figure 9 montre qu'il y a dans la préparation brute M révélée après l'électrophorèse avec le sérum 906, plusieurs constituants, certains avec des mobilités qui diffèrent peu, d'autres qui ont des mobilités bien distinctes.

Le sérum 341 bis nous permet de mettre en évidence la ligne correspondant à la réaction toxine-antitoxine. Notons un certain aspect bifide d'une des extrémités de cette ligne. Nous voyons qu'il y a plusieurs autres antigènes avec une mobilité électrophorétique peu différente de celle de la toxine. La préparation T testée dans les mêmes conditions présente uniquement la ligne de réaction spécifique toxine-antitoxine.

Le sérum 906 précipité par la toxine T (906-AT) et une préparation M, nous montrent toutes les lignes présentes dans la première expérience, sauf celle de la toxine. Cette expérience nous montre donc que la réaction toxine-antitoxine diphtérique renferme un seul système précipitant. Si la préparation T est testée avec le sérum 906-AT, elle ne donne aucune réaction. Nous avons fait la même expérience à l'envers et épuisé une préparation M par le sérum 341 bis. L'électrophorèse de cette préparation M-T révélée avec le sérum 906 nous montre de nouveau toutes les lignes présentes dans la préparation M, sauf celle de la réaction toxine-antitoxine; le sérum 341 bis ne réagit plus avec cette préparation.

Nous avons calculé la vitesse électrophorétique de la toxine T en la comparant à celle des constituants reconnus et identifiés du sérum humain. Nous avons trouvé que la toxine dans ces conditions expérimentales précisées (tampon véronal $I/2 = 0,05$; $PH = 8,2$) a une mobilité légèrement inférieure à celle d'une α -1-globuline et qu'on peut estimer sa vitesse à $5.10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Les calculs ont été faits par électrophorèse simple en gélose ainsi que par immuno-

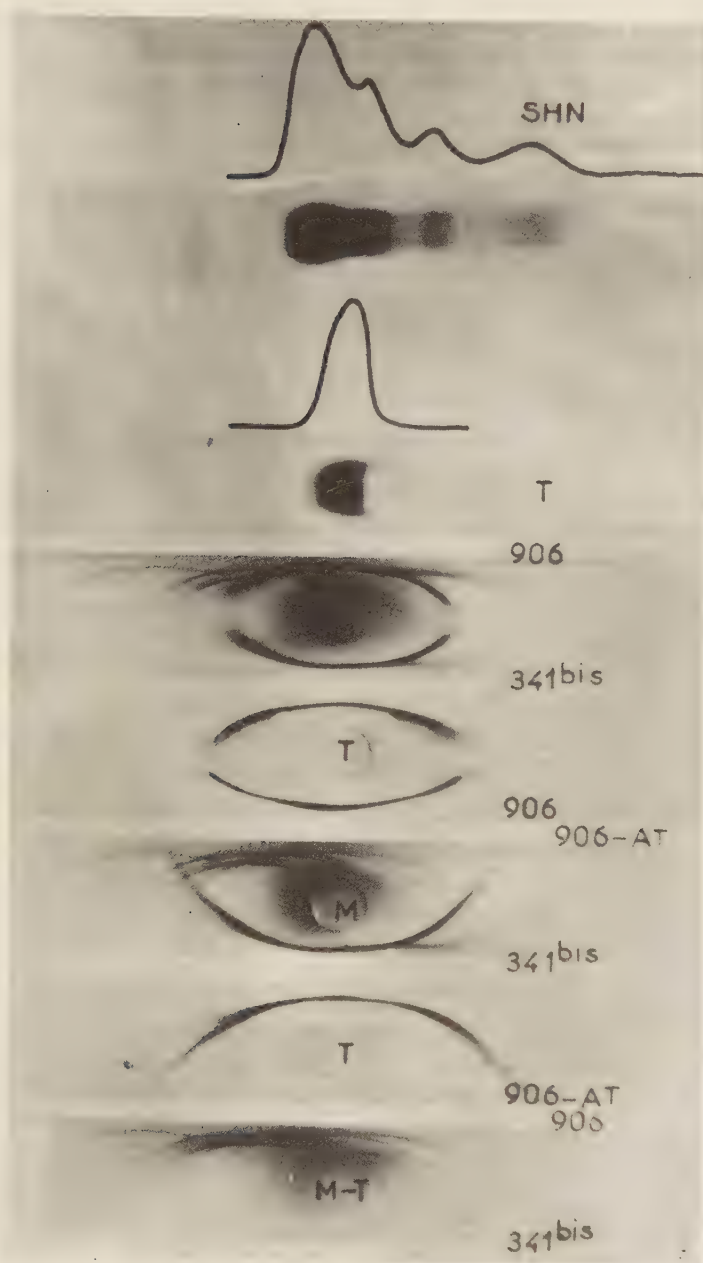


FIGURE 9. Application de la technique d'électrophorèse en gélose ainsi que de la technique d'immunoélectrophorèse à l'étude de la complexité de diverses préparations de la toxine diphtérique. (Les caractères des diverses préparations testées sont décrites p. 42.)

électrophorèse. La tache obtenue par électrophorèse simple présente, après mesure photométrique, une courbe d'absorption tout à fait symétrique.

Peterman et Pappenheimer (217) trouvent pour une toxine à 2170 UF/mg N à pH = 7,35 et $\Gamma/2 = 0,100$, une mobilité de $4,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Ils n'ont pu mettre en évidence les impuretés encore présentes dans cette préparation par la technique d'électrophorèse.

Nous avons déterminé la constante de diffusion de la toxine diphtérique par la technique de simple diffusion en gélose. Nous avons employé des tubes ayant un diamètre de 0,6 cm. Le sérum employé était le N° 1451 (saignée du 82° jour), dilué au 1/100 en tampon phosphate de potassium M/15, NaCl 0,172 M, pH = 6,8, gélifié à 0,5 %. La diffusion a été étudiée avec une toxine à 250, 116,5, 125, 83,5, 62,5 et 41,7 UF/ml. La couche de sérum gélifié avait une hauteur de 4 cm tandis que la couche de toxine dans le même tampon non gélifié avait une hauteur de 1,5 cm. Pour éviter des changements de température, on a fait plusieurs séries de tubes. Chaque série est photographiée après un temps déterminé à 37°.

La figure 10 montre le déplacement du front en fonction du temps pour les diverses concentrations et la figure 11 les valeurs de K^2 par rapport au log. Ag. La constante de diffusion de la toxine diphtérique calculée à l'aide de la formule (7) est égale à $6,15 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

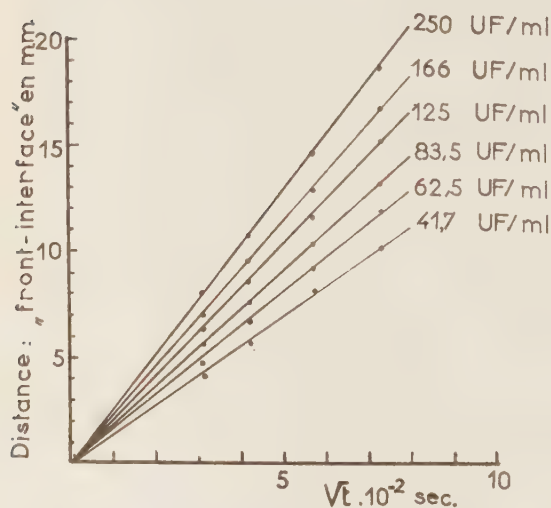


FIGURE 10. Détermination de la constante de diffusion de la toxine diphtérique par la technique de simple diffusion en gélose. Déplacement du front de précipitation spécifique en fonction du temps pour diverses concentrations de toxine.

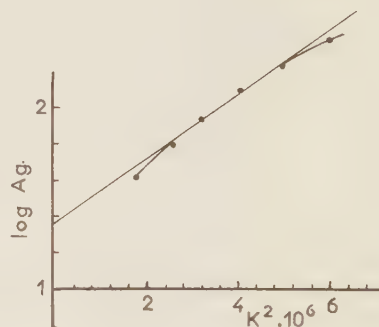


FIGURE 11. Détermination de la constante de diffusion de la toxine diphtérique par la technique de simple diffusion en gélose. Valeurs de K^2 par rapport au Log. Ag.

6. DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES TECHNIQUES EMPLOYÉES

a) Immuno-électrophorèse (technique de Grabar et Williams).

Préparation des plaques d'immuno-électrophorèse. — On utilise des plaques photographiques (verres à doubler) de format 13×18 . Les plaques sont contrôlées et on utilise celles qui sont sans défaut. On verse sur les plaques une solution chaude de gélose à 1,5 %. On étale la gélose sur les plaques, avec un agitateur tenu entre les deux index, afin d'obtenir une couche aussi mince que possible. Après refroidissement, on laisse sécher les plaques à l'étuve. Une fois sèches, on les marque avec de l'encre indélébile, sur les côtés non gélosés, à l'endroit où se situe la cupule de départ et à l'emplacement des baguettes de verre. On colle avec de l'albuplast de 1 cm de large deux bandes de papier filtre épais, de 13×4 cm, aux deux extrémités, sur la face gélosée.

Dans une cuvette de 25×65 cm, on coule d'abord 1 litre de solution de gélose à 1,5 % afin d'obtenir une surface plane. On pose quatre plaques dans la cuvette de telle façon que les papiers filtres qui dépassent les plaques de 3,5 cm environ, reposent sur deux lames de verre de $60 \times 3,5$ cm. Sur chaque plaque, on dispose 6 baguettes de verre de 14 cm de long et de 4 mm de diamètre. Si l'on commence à 7 mm de l'un des bords, la distance entre les baguettes sera d'environ 1,8 cm, la place de chacune des baguettes ayant été indiquée sur l'envers de la plaque.

Préparation de la gélose. — La gélose est dissoute dans le tampon suivant :

Diethylmalonylurée sodée 79,25 g

H₂O q.s.p. 10 l

Ajuster à pH = 8,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré.

Chauffer jusqu'à ébullition 1 litre de ce tampon. Ajouter 15 g de gélose Difco et agiter sur la flamme jusqu'à ce que toute la gélose soit dissoute. Placer ensuite le flacon dans un bain-marie à 100°, ajouter 10 ml de merthiolate (solution à 1 %). Attendre jusqu'à ce que la gélose ne contienne plus de bulles d'air. On verse la gélose sur les plaques afin d'obtenir une couche d'environ 3 à 4 mm d'épaisseur, chose facile à réaliser si l'on tient compte du fait que les baguettes ne doivent pas être complètement immergées dans la gélose. Les baguettes qui auront été déplacées au cours de cette opération seront remises en place. On roule sur les papiers filtres une autre baguette ayant la longueur du bac et 1 cm de diamètre, pour chasser l'air sous les papiers; on laisse la baguette reposer sur l'extrémité des papiers filtres pour éviter que ceux-ci ne se relèvent.

En général, les plaques sont préparées 24 h à l'avance. Le lendemain, elles sont démoulées c'est-à-dire qu'on les découpe le long de chacun de leurs 4 côtés et le long du papier filtre. On les retire avec une spatule courbe et on les met à plat sur la pailleasse. Avec un emporte-pièce de 0,9 cm de diamètre, on perce 5 trous au milieu de la plaque et entre les six baguettes. Un volume de la solution à ana-

lyser à 45° est mélangé avec un volume de gélose également à 45°. On prend la même gélose que pour la préparation des plaques. Dans chaque trou, on met d'abord une goutte de gélose tamponnée et ensuite 0,1 ml de la solution à analyser. Après refroidissement, les cupules sont entièrement remplies avec la gélose tamponnée (environ 2 gouttes). Le papier filtre est ensuite plié à angle droit; dans la fente ainsi obtenue, on coule quelques gouttes de gélose pour faire le joint. Les plaques sont alors posées entre les deux bacs de façon à ce qu'elles reposent sur les bords et que les papiers filtres trempent dans le tampon.

Dispositif de l'électrophorèse (voir figure 12). — Le courant est fourni par un redresseur de courant donnant une tension de 350 V sous une intensité d'au moins 200 milliampères. Une résistance variable permet de régler la tension.

Comme vases électrodes, on utilise deux bacs en lucoflex de 60 × 7 × 5,5 cm. Les électrodes, deux fils de platine ayant la longueur du bac, sont montées sur une plaque de lucoflex ayant la forme d'un peigne et la longueur et la hauteur du bac. Cette plaque divise le bac en deux (les dents étant placées tête en bas); d'un côté il y a les électrodes, dans l'autre trempent les papiers filtres.

L'électrophorèse dure en général 4 heures sous une tension de 70 V mesurée à l'extrémité des plaques de verre; le courant total pour les quatre plaques est d'environ 180 milli-ampères. Pendant toute l'électrophorèse, on laisse couler du

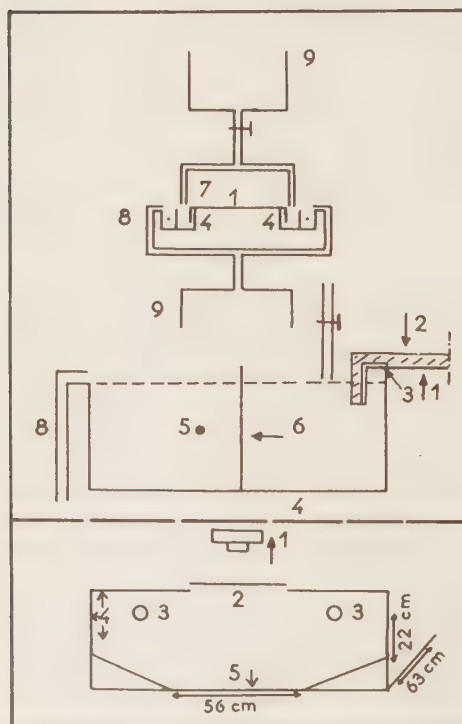


FIGURE 12. 1. Plaque de verre; 2. Couche de gélose; 3. Papier filtre; 4. Bacs en lucoflex; 5. Electrode en platine; 6. Séparation du bac; 7 et 8. Conduits de tampon; 9. Réservoir de tampon.

FIGURE 13. 1. Appareil photographique, type reflex à film de 35 mm (Rectaflex ou Zeiss Contaflex); 2. Plaque de verre; 3. Tube de néon, type « day-light » (20 watts); 4. Surface peinte en blanc; 5. Surface peinte en noir.

tampon dans les deux bacs pour que le pH ne varie pas. Une fois l'électrophorèse terminée, on découpe les papiers filtres à l'extrémité de chaque plaque et on les sèche avec un morceau de papier filtre.

Avec une spatule, on trace deux traits le long des baguettes et on les retire ensuite à l'aide d'une petite pince. Dans les rigoles ainsi obtenues, on coule 1 à 2 ml de la solution de détection. Les plaques sont ensuite placées dans une chambre humide à 37°. Les plaques restent 7 à 14 jours à l'étuve.

Coloration des plaques (technique Uriel et Grabar). — Les plaques sont d'abord lavées pendant 4 jours avec une solution d'eau physiologique renouvelée chaque jour. On les recouvre ensuite avec un morceau de papier filtre ayant leur dimension. On chasse les bulles d'air. Les plaques restent ensuite à 37° jusqu'à ce qu'elles soient complètement sèches. L'utilisation de plaques incomplètement séchées entraînerait l'échec des opérations ultérieures.

Les plaques sont ensuite trempées dans la solution de lavage (cf. plus loin). Ceci permet d'enlever le papier filtre sans qu'il subsiste des fibres de papier sur la plaque. La gélose est réduite à une couche mince et transparente. On laisse les plaques dans le colorant jusqu'à ce que les lignes de précipitation soient entièrement colorées (environ 1 à 2 heures). Ceci se voit facilement en sortant les plaques du colorant.

Colorant.

Tampon acétate	900 ml
(Acide acétique	30 g
Acétate de sodium, 3 H ₂ O ..	6,8 g
H ₂ O, q.s.p.	1 l)
Glycérine	100 ml
Amidoschwarz	1 g

Les plaques sont ensuite lavées dans le bain suivants, jusqu'à ce que le fond soit complètement incolore.

Bain lavage.

Eau	830 ml
Acide acétique pur	20 ml
Glycérine	150 ml

Après lavage, on laisse sécher les plaques à l'étuve. Une fois sèche, on peut facilement décoller la gélose après en avoir découpé les bords. La gélose se présente comme un film ayant la dimension de la plaque et dans lequel les lignes de précipitation colorées sont bien visibles.

Les plaques ainsi colorées sont posées sur une feuille de papier calque et photographiées sur un fond noir. Nous avons employé du film Kodak Plus-X et du révélateur D-72. On fait deux expositions d'une demie seconde avec les diaphragmes de 16 et 22. Les agrandissements se font sur du papier doux ou normal. La figure 13 reproduit un schéma du dispositif photographique.

Electrophorèse simple en gélose : L'électrophorèse simple en gélose se fait exactement de la même façon que l'immunoélectrophorèse, à cette différence près que les rigoles de détection sont superflues et que les cupules sont rectangulaires (13×4 mm).

Une fois l'électrophorèse terminée, on met les plaques dans un bain d'acide acétique à 2 % pendant 12 heures. Les plaques sont séchées, colorées et photographiées comme pour une immuno-électrophorèse.

b) *Précipitation spécifique en gel* (Technique Oakley et Fulthorpe).

Nous avons utilisé des tubes d'un diamètre intérieur de 9 mm et d'une hauteur de 10 cm. Il est utile de préparer une solution stock de gélose 2 fois concentrée, qui est ensuite diluée avec la solution protéique et de l'eau; ceci permet de préparer un grand nombre de tubes en peu de temps.

Solution de gélose

Gélose Difco	1,5 g
NaCl	2 g
Merthiolate 1/100	2 ml
H ₂ O, q.s.p.	100 ml

A l'aide de l'encre de chine, on marque sur les tubes des traits qui correspondent à un volume de 0,5-1 et 0,5 ml, afin de pouvoir verser dans le tube 0,5 ml de la solution protéique gélosée (antigène ou anticorps), 1 ml de la couche intermédiaire (gélose simple) et ensuite 0,5 ml de la solution protéique non gélosée.

La couche intermédiaire peut avoir un volume plus grand si l'on désire des anneaux plus séparés, mais dans ce cas la réaction est plus lente, on doit laisser les tubes plus longtemps à l'étuve; ou l'on peut prendre une couche intermédiaire à volume réduit, par exemple 0,5 ml, ceci si l'on veut seulement déceler la présence ou l'absence d'antigènes ou d'anticorps comme dans les surnageants des précipitations quantitatives; la formation d'anneaux est alors plus rapide.

Le volume de solution protéique nécessaire pour un certain nombre de tubes étant connu, on prépare cette solution en mélangeant à volume égal : la gélose à 45° et la solution protéique à concentration calculée. Les deux solutions seront donc deux fois diluées, la concentration en gélose sera de 0,75 %. A l'aide d'une pipette Pasteur, on fait couler dans les tubes la première couche sans toucher les bords du tube. Après refroidissement de la gélose, on coule la couche intermédiaire. La gélose est d'abord diluée avec un volume égal d'eau. Ensuite on termine par la solution protéique non gélosée.

Les tubes sont fermés avec un bouchon de liège; ils sont photographiés après deux ou trois semaines à 37°, avec le dispositif reproduit dans la figure 13, sur film Kodak Microfile Orthochromatique; temps de pose : 1 seconde à f/11 et f/8.

c) *Précipitation spécifique en gel* (Technique Ouchterlony).

On utilise des boîtes de Pétri d'un diamètre de 5,5 cm et d'une hauteur de 1,7 cm. On met dans chaque boîte 19 ml de gélose, dont la composition est la suivante :

Gélose Difco	4,5 g
NaCl	3 g
Merthiolate 1/100	3 ml
H ₂ O q.s.p.	300 ml

Après refroidissement, on place les boîtes sur un carton où est dessinée la disposition des réservoirs. Au milieu de la boîte, on fait alors à l'aide de l'emporte-pièce, un réservoir de 0,9 cm de diamètre, puis à une distance de 1 cm, quatre autres autour de celui-ci. Dans chaque réservoir, on met d'abord une goutte de gélose, et ensuite 0,2 ml des solutions à analyser. Les boîtes sont fermées avec de la pâte à modeler.

Pour photographier les boîtes, on les lave d'abord à l'eau distillée, et on laisse dans chacune d'elles un peu d'eau recouvrant complètement la surface de gélose. Elles sont ensuite placées sur une feuille de papier photographique très dur. L'exposition se fait par transparence avec une lampe opaque. La présence de lignes de précipitation se traduit par un trait blanc sur fond noir. On peut également photographier les boîtes sur un fond noir comme on le fait pour la précipitation spécifique en tubes.

Nous avons mis au point une modification de la technique d'Ouchterlony permettant d'analyser en même temps un grand nombre d'échantillons. Nous avons remplacé les boîtes de Pétri par des plaques de verre supportant une couche de gélose de 4 à 5 mm d'épaisseur. La gélose est préparée comme pour la technique en boîte. Dans une cuvette on coule une solution de gélose à 1,5 % afin d'obtenir une surface plane. Après refroidissement, on place sur la gélose des plaques de verre préparées comme pour la technique de l'immuno-électrophorèse. On coule sur les plaques la solution de gélose afin d'obtenir la hauteur prévue. Après refroidissement, les plaques sont démoulées. A l'aide d'un emporte-pièce, on perce des réservoirs comme le montre la figure 8 ou suivant un autre schéma. Les réservoirs sont remplis avec les différentes solutions d'antigènes et d'anticorps. Le développement des lignes se fait dans une chambre humide à 37°. Les plaques sont ensuite lavées et colorées par la technique décrite pour l'immunoélectrophorèse. La reproduction photographique est fait de nouveau sur fond noir, ex. fig. 8.

7. RÉSUMÉ

L'application des techniques de diffusion en gélose : la simple diffusion en gélose, la double diffusion en gélose et l'immuno-électrophorèse, à l'étude du système toxine-antitoxine diphtérique ont été décrites. Les expériences ont été faites avec des toxines brutes, des toxines partiellement purifiées, ainsi que des préparations pures. Les anti-sérums employés contenaient d'une part tous les anticorps anti-protéines sécrétés par le bacille diphtérique et d'autre part uniquement l'antitoxine.

Il a été démontré que les préparations brutes et partiellement purifiées donnent avec un sérum complexe plusieurs lignes de précipitation spécifique tandis que la toxine pure en donne une seule. Les sérums contenant uniquement des anticorps dirigés contre la toxine donnent avec toutes les préparations de toxine : brutes, partiellement purifiées et pures, de nouveau une seule ligne de précipitation spécifique.

Diverses expériences de précipitation de la toxine par l'antitoxine ont été effectuées et il a été démontré avec la technique d'immuno-électrophorèse, qu'il y a toujours seulement un système réagissant. La constante de diffusion ainsi que la vitesse électrophorétique de la toxine ont été déterminées.

Hyperimmunisation des chevaux avec l'anatoxine diphtérique purifiée

1. INTRODUCTION

En 1890, von Behring (16, 17) découvrit l'antitoxine diphtérique et ouvrit une voie nouvelle à la lutte contre les maladies infectieuses, la sérothérapie et la vaccination. En effet, il trouva dans le sang des animaux qui n'avaient pas succombé à l'administration d'une dose trop faible de toxine, une substance capable de neutraliser cette toxine : « l'antitoxine ». Cette neutralisation de la toxine, qui peut être mise en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, est une réaction tout à fait spécifique. Les sérums qui neutralisent la toxine diphtérique n'ont aucun effet sur d'autres toxines, la toxine tétanique par exemple.

Les anticorps font partie des globulines sanguines. Bien qu'ils aient des réactions spécifiques, ce sont toutefois des corps très voisins, et la preuve en est facile à fournir. Par exemple, les anticorps anti-globulines normaux préparés à partir des globulines de sérum normal de cheval, réagissent avec les anticorps anti-toxines.

La réaction entre la toxine et l'antitoxine diphtérique n'est pas très stable, et l'on peut démontrer sa réversibilité sous l'influence des acides, de l'anatoxine, de la dilution et de nombreux autres facteurs. Madsen *et al.* (160, 161) ont mis en évidence l'effet de la dilution : un mélange de toxine et d'antitoxine diphtériques inoffensif pour le cobaye, injecté au lapin par voie intraveineuse, peut faire succomber celui-ci du fait de la dilution du mélange, de la dissociation du complexe et de la libération de la toxine dans un grand volume de sang.

Glenny *et al.* (90) ont montré le fait suivant : 1ml d'un certain mélange de toxine et d'antitoxine (non avide) peut être injecté à l'animal sans qu'il présente de trouble. Si l'on injecte 1 ml du même mélange dilué 1 000 fois, les animaux meurent. Ils décrivaient ainsi un des caractères essentiels des sérums non avides. L'avidité des sérums a, depuis, fait l'objet de très nombreuses études, sans qu'un accord unanime ait pu encore se faire sur la nature exacte du phénomène.

L'antitoxine amène donc la neutralisation de la toxine et avec elle, la disparition

des signes cliniques. L'existence des germes sécrétant la toxine dans l'organisme, devient comparable à celle d'autres microorganismes banaux. La présence de la toxine ou de ses dérivés atoxiques dans l'organisme amène donc une production d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette toxine. La quantité d'anticorps présents diminue lentement, mais un éventuel contact avec le microorganisme producteur de la toxine est à considérer comme un rappel et sera suivi d'une libération massive d'anticorps.

Pendant la première période, celle qui suivit immédiatement la découverte de von Behring, la production d'antitoxine se faisait par injection de filtrats toxiques : les doses, d'abord faibles, puis d'une force toujours croissante, étaient administrées aux animaux capables de fournir une grande quantité de sérum. Parmi eux, le cheval se montrait le plus utilisable. Dans les années qui suivirent, on arriva à perfectionner l'immunisation, donc à augmenter la formation des anticorps chez les animaux par l'utilisation de dérivés atoxiques mais encore hautement antigéniques et par l'adsorption de l'antigène.

L'injection de filtrats de culture toxiques est un procédé très délicat; les doses supportables peuvent être très facilement dépassées, ce qui amène la mort de l'animal; s'il survit, l'injection de la toxine provoque toujours des effets toxiques, voire même le mauvais état de l'animal pendant l'hyperimmunisation.

En 1894, Roux et Martin (259) mirent au point la détoxification par la « liqueur de Gram ». Les quantités d'iode à ajouter à la toxine sont cependant difficiles à déterminer; une trop faible quantité peut déclencher des effets toxiques; au contraire, si l'on dépasse la dose, le pouvoir antigénique se perd et il n'y a pas formation d'anticorps.

L'emploi d'un mélange presque neutre de toxine et d'antitoxine diphtériques pour l'immunisation des chevaux fut essayé avec succès par Smith (279, 280), et mis au point par lui. Il obtint de très bons résultats, de sorte qu'ultérieurement von Behring (18) et Park (215, 216) l'utilisèrent pour la vaccination des enfants. Cependant, la préparation de ce mélange, à pouvoir antigénique efficace mais à effets inoffensifs, est très délicate et l'on enregistra des cas mortels.

L'étude systématique des moyens chimiques ou physiques pour découvrir l'antigène vaccinant et atoxique fut entreprise par différents chercheurs. Elle amena la découverte de l'action du formol et la transformation des toxines en dérivés formolés : les anatoxines, vaccins par excellence. En 1898, Salkowski (263) signala l'action du formol transformant la toxine diphtérique en un produit atoxique. Ce dérivé, injecté au cheval, donne naissance à des anticorps. Une étude systématique fut publiée par Löwenstein (149). Celui-ci étudia la transformation de la toxine tétanique en dérivé atoxique non seulement par voie chimique, mais aussi par des moyens physiques, tels que la lumière et la chaleur. Parmi tous les produits étudiés, c'est le formol qui, à une concentration de 2 pour 1 000 et combiné à l'action de la lumière, transforme le mieux la toxine en conservant à celle-ci son pouvoir antigénique. La détoxification se fait plus rapidement à 37° qu'à la glacière.

L'immunisation des lapins et des cobayes entraîne la formation d'anticorps chez les deux espèces; toutefois, les titres sont plus élevés chez les premiers que chez les seconds.

Von Eisler et Löwenstein (67) étudièrent aussi l'action du formol couplée à la lumière artificielle. Ils trouvèrent que la toxine tétanique se transforme en produit atoxique en 12 jours, à une concentration de 3 pour 1 000 de formol. La transfor-

mation se fait aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité totale. Des expériences de vaccination sur l'homme furent publiées en 1915, ainsi que d'autres sur l'hyperimmunisation des chevaux (68). L'auteur signalait que la toxine tétanique est déjà détoxifiée après un séjour de 28 heures à 52° sous l'action de 2 pour 1 000 de formol. La quantité d'anticorps formée par le cheval est proportionnelle à la dose injectée. Les résultats de l'immunisation d'un grand nombre de chevaux furent publiés en 1919.

Glenny et Südmersen en 1921 (79) et Glenny et Hopkins en 1923 (80) immunisèrent des animaux avec la toxine diphtérique formolée. Il faut signaler que leurs dérivés n'étaient pas tout à fait détoxifiés. Les auteurs trouvèrent entre autres que le cobaye vacciné avec cet antigène ne succombe pas si on lui injecte trois semaines plus tard, deux doses mortelles de toxine. Ils entrevirent déjà la grande valeur pratique de ce procédé et annoncèrent qu'on pouvait arriver à obtenir par concentration, un vaccin qui serait de loin plus actif que tous les autres employés jusqu'alors.

En 1922, Ramon (238) découvrit l'application pratique de la réaction de précipitation au titrage de la toxine et de l'antitoxine diphtériques, le phénomène de « floculation ». Si, à un volume fixe de filtrats de culture diphtérique contenu dans une série de tubes, on ajoute des doses croissantes d'antitoxine, on voit apparaître au bout d'un certain temps et dans l'un des mélanges de la série, une floculation que l'auteur qualifie de « floculation initiale ». Ce mélange qui flocule le premier est celui qui ne contient ni toxine ni antitoxine libres; c'est donc là un test qui peut servir au titrage de la toxine et de l'antitoxine diphtériques.

En 1923, Ramon (243) mit au point la transformation de la toxine diphtérique en dérivé atoxique sous l'influence simultanée de la chaleur et du formol, agissant dans des conditions bien déterminées. Le dérivé obtenu, que l'auteur appela anatoxine diphtérique, conserve à la fois la propriété floculante *in vitro* et l'activité immunisante *in vivo* de la toxine. L'auteur montra (244) qu'il existe une relation très étroite entre ces deux propriétés de l'anatoxine, le pouvoir floculant déterminé *in vitro* pouvant servir à déterminer l'activité immunisante *in vivo* de l'anatoxine.

L'activité immunisante d'un vaccin, propriété biologique, peut donc être traduite par une simple réaction, la floculation, ce qui est de la plus grande importance, non seulement pour l'emploi *in vivo* du vaccin (mesure de la valeur antigénique de l'anatoxine), mais encore pour pouvoir suivre facilement la production des anticorps pendant l'hyperimmunisation, grâce à ce procédé simple, rapide et peu coûteux.

Ramon obtint des résultats identiques en hyperimmunisant un grand nombre de chevaux, soit avec l'anatoxine, soit avec la toxine, dans ce dernier cas avec injection préalable d'anatoxine. Les sérums obtenus dans les deux cas sont équivalents par leur qualité antitoxique et par leur titre. On a donc atteint le but fixé : obtenir un dérivé de la toxine diphtérique qui soit atoxique tout en conservant son activité immunologique. Mais il reste encore à signaler un phénomène qui joue un rôle important dans l'obtention de sérums à titres élevés en antitoxines : c'est l'immunité naturelle.

Déjà en 1894, Roux et Martin (259) démontraient que le sérum de cheval neuf peut donner une protection au cobaye. L'existence d'antitoxine diphtérique dans le sérum normal de cheval fut aussi signalée par Ferre en 1896 (71). Bingel (19, 20), utilisant du sérum normal pour le traitement de la diphtérie, concluait que

l'antitoxine ne jouait aucun rôle. En 1908, Schick (275) mit au point une réaction permettant de reconnaître la présence d'anticorps en circulation. Il injecta à des enfants, par voie intradermique, de très faibles doses de toxine diphtérique. L'absence d'anticorps se traduisit par l'apparition d'une tache rouge, de 1 à 3 cm de diamètre, au bout de un à trois jours. Par suite de la vaccination, cette réaction devint négative et permit de constater l'immunité obtenue.

Hitchens et Tingley (112) appliquèrent en 1917 la réaction de Schick au cheval. Ils injectèrent dans la paupière une quantité de toxine égale à une ou deux doses mortelles pour le cobaye. Certains chevaux n'eurent aucune réaction, ils possédaient donc une immunité naturelle et ils furent dits à « Schick négatif »; leur sérum contenait de l'antitoxine en très faible quantité. Au contraire, les chevaux à « Schick positif » eurent une réaction œdémateuse de 1 à 3 cm de diamètre en général, cette dimension étant déterminée par l'âge et l'origine des animaux.

Utilisant des chevaux à « Schick négatif », Sordelli (282) prépara en un temps très court des sérums d'une haute valeur antitoxique avec la toxine non modifiée.

Glenny *et al.* (79, 81), signalèrent aussi l'existence d'anticorps naturels chez l'homme et le cheval. L'injection de l'anatoxine à ces chevaux donne naissance à une production rapide d'anticorps, alors que celle-ci est très tardive chez les animaux non immunisés naturellement.

L'étude comparative de la production d'anticorps fut faite par différents auteurs; les résultats démontrèrent toujours que les chevaux possédant une immunité de base sont de bons producteurs d'anticorps, alors que les chevaux à « Schick positif » donnaient des titres généralement bas. Signalons aussi les travaux de Celarek et Porebski (43) qui obtinrent en moyenne 1 000 unités chez les animaux à Schick négatif et 250 chez les autres.

Ramon (247) trouva, à la suite d'une expérience sur 100 chevaux, que l'antitoxine augmente immédiatement après la première injection chez les animaux à Schick négatif, alors qu'on ne retrouve la même quantité d'antitoxine qu'après la deuxième ou troisième injection chez les animaux à réaction positive. Tenant compte de ce résultat, il fut d'usage depuis lors d'éliminer les chevaux à Schick positif pour la production de l'antitoxine diphtérique.

En 1925, Ramon (245, 246) fit connaître le *principe des substances adjuvantes et stimulantes* et par là, une nouvelle technique permettant d'accroître la formation des anticorps. Ce principe a été de plus en plus perfectionné et de nos jours, il est universellement appliqué dans le domaine des vaccinations et de l'hyperimmunisation. Ramon observa que la production d'anticorps est supérieure chez les animaux qui, au cours de l'hyperimmunisation, présentent une inflammation ou un abcès à l'endroit de l'injection. Il démontra qu'il est possible de provoquer artificiellement cette augmentation des anticorps en ajoutant à l'anatoxine des produits non spécifiques, tel que le tapioca.

Au tapioca vinrent s'ajouter toute une série d'autres substances sur lesquelles les antigènes sont adsorbés ou qui donnent naissance à une inflammation; ce sont des sels de calcium, de magnésium et d'aluminium, la lanoline, le tanin, le kaolin, le charbon (117, 93, 261, 262).

L'injection de bacilles tuberculeux dans la cavité péritonéale d'un cobaye, suivie de l'injection d'autres antigènes, amène une formation accrue d'anticorps dirigés contre ces antigènes (75). L'emploi de bacilles tués n'a pas le même effet, mais il est possible d'obtenir une sensibilisation très forte à la tuberculine si ces bacilles

sont mélangés à l'huile de paraffine. Ces observations ont été le point de départ de l'obtention des mélanges préparés par Freund et ses collaborateurs (73), et qui servent à la sensibilisation et à la production d'anticorps. Il a été possible de remplacer des bacilles vivants par des bacilles tués, à condition de se servir des émulsions « huile-eau ». Une solution aqueuse d'antigène est mélangée à de l'huile de paraffine; on y ajoute des mycobactéries tuées et un mouillant.

La production de l'antitoxine diphtérique a été étudiée par Freund *et al.* (74). L'effet obtenu est très supérieur à celui de l'antigène fluide et la réactivité acquise plus effective qu'avec l'alun.

Notons également que l'effet des mycobactéries est surtout net si l'on veut sensibiliser des animaux. Pour la production d'anticorps ainsi que pour l'obtention d'une immunité potentiellement développée, les émulsions sans bactéries sont aussi effectives. Il est regrettable que l'on ne puisse appliquer cette méthode à l'immunisation de l'homme. Cependant, elle reste fort employée en laboratoire.

Glenny et ses collaborateurs (85) montrèrent, un an après la découverte de Ramon, que le précipité obtenu en ajoutant de l'alun de potassium aux anatoxines brutes a un pouvoir antigénique environ cent fois supérieur à celui de l'anatoxine brute et ceci pour une seule injection. Pour diminuer les réactions locales, Glenny *et al.* (87) lavèrent le précipité obtenu à l'eau physiologique et obtinrent un vaccin qui avait presque complètement perdu ses propriétés irritantes tout en conservant son pouvoir antigénique. L'usage s'établit rapidement d'employer le précipité d'alun de potassium qui a un pouvoir antigénique élevé. Sa valeur dans la vaccination des enfants est incontestable, car on obtient une immunité complète avec deux injections seulement, suivies d'un rappel. Le précipité obtenu par l'alun de potassium est un mélange d'hydroxyde et de phosphate d'aluminium, lesquels peuvent d'ailleurs être utilisés comme adjuvants.

Une étude très approfondie de l'emploi du phosphate d'aluminium fut faite par Holt (113) et Ramshorst (254). Les auteurs mirent au point la préparation de l'adjuvant, indiquèrent les conditions optima de l'adsorption et la quantité de gel de phosphate d'aluminium à ajouter à une quantité déterminée d'anatoxine.

L'emploi d'un gel d'hydroxyde d'aluminium fut indiqué par Scheibel (271, 272) et Schmidt et Hansen (277).

Le pouvoir immunisant plus élevé des antigènes adsorbés comparé aux antigènes non adsorbés a été expliqué par Glenny (89). L'injection de l'antigène en présence d'un adjuvant amène la formation d'un dépôt de sorte qu'il n'y a pas de résorption et d'élimination rapide par l'organisme; l'antigène reste à l'endroit de l'injection, d'où il se libère lentement; sa mise en circulation se fait graduellement et son pouvoir stimulant devient continu. On peut le comparer à un grand nombre d'injections de rappel. Il y a production accrue d'anticorps.

Si l'on injecte de l'anatoxine adsorbée sur alun à des cobayes, il est possible d'immuniser d'autres animaux avec les prélèvements effectués quelques semaines plus tard à l'endroit de l'injection (70, 101).

D'autres facteurs jouent certainement aussi un rôle. Eisler et Eibl (69) démontrèrent que le pouvoir antigénique décroît lorsque les particules sont plus petites. La diminution de la quantité d'aluminium dans le dépôt au cours de la première semaine qui suit l'injection est appréciable. Par la suite, il y a enkystement du dépôt et la quantité libérée est moindre. C'est ainsi que Prigge (236) établit aussi que la formation maximum d'anticorps se fait au bout de la même période avec

une anatoxine non adsorbée ou avec une anatoxine adsorbée. Les quantités totales sont naturellement plus élevées dans le dernier cas. Gundel et König (100) démontrèrent que l'immunisation se fait plus vite avec l'anatoxine adsorbée. Tout ceci n'est pas favorable à la théorie du dépôt et à celle de la libération lente de l'antigène.

Holt (113) a démontré que si l'on vaccine des cobayes avec de l'anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate d'aluminium et qu'on fasse une excision du nodule formé 7 à 14 jours après l'injection, la formation d'anticorps reste la même. Les titres trouvés après 4 à 7 semaines sont comparables à ceux des animaux chez qui l'antigène n'a pas été prélevé. Si par contre l'antigène prélevé est réinoculé aux mêmes animaux à un autre endroit, il produit l'effet d'une injection de rappel et une augmentation du titre en anticorps.

La formation d'anticorps reste faible si l'excision est faite quatre jours après la vaccination. L'antigène adsorbé est donc résorbé pendant les premiers jours qui suivent l'injection et devient par la suite encapsulé, ce qui amène un arrêt de son action physiologique.

L'auteur observe le développement d'un état inflammatoire accompagné de phagocytose des particules injectées. Les leucocytes seraient les transporteurs de l'antigène adsorbé vers des cellules et des tissus producteurs d'anticorps.

D'autres faits intéressants ont été rapportés par d'Antona et Piazzzi (6) lesquels ont fait une grande série d'expériences d'immunisation avec l'anatoxine diphtérique brute et purifiée. L'antigène utilisé est soit non absorbé, soit adsorbé sur l'hydroxyde d'aluminium ou émulsionné dans l'huile. Ces auteurs montrent que l'immunité est toujours plus élevée et plus durable si des stimuli forts succèdent à des stimuli faibles. L'antigène adsorbé ou émulsionné, comparé à l'antigène non adsorbé, amène, lors de la première injection, une production plus élevée et plus rapide d'anticorps. Le contraire se produit lors de la seconde injection, la production d'anticorps est plus élevée si l'on administre de l'antigène fluide. L'action des adjuvants est seulement nette et efficace lors de la première injection et chez des sujets neufs; elle se montre d'une importance indiscutable pour le développement de l'immunité à la suite d'injections de rappel ultérieures.

2. PLAN DE RECHERCHES PERSONNELLES

Nous nous sommes proposé d'étudier la formation d'antitoxines chez les chevaux avec des préparations purifiées d'anatoxine diphtérique. Nous avons suivi la production des anticorps par la technique de diffusion en gélose; l'influence de la présence d'impuretés sur la production d'anticorps autres que l'antitoxine a été démontrée.

La production d'anticorps a été étudiée chez des chevaux sans immunité de base ainsi que chez des chevaux avec immunité de base (chevaux à Schick positif et chevaux à Schick négatif). La mobilité électrophorétique des anticorps formés durant l'hyperimmunisation a été mise en évidence par la technique de l'immuno-électrophorèse. L'évolution des titres *in vivo* et *in vitro* durant l'hyperimmunisation par rapport à la mobilité électrophorétique des anticorps a été étudiée. On a employé l'anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium, préparée selon la technique décrite dans le chapitre III. La formation d'anticorps chez le lapin a été étudiée.

RÉSULTATS DES RECHERCHES PERSONNELLES

3. L'HYPERIMMUNISATION DES CHEVAUX AYANT UNE IMMUNITÉ DE BASE, AVEC DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE PURIFIÉE

Nous avons d'abord essayé d'immuniser un cheval en ne faisant de nouvelles injections vaccinales qu'après avoir constaté un palier ou même un début de chute dans la courbe du taux d'antitoxine en fonction du temps. Une injection faite à ce moment devait donc fonctionner comme injection de rappel et amener une augmentation des anticorps. L'anatoxine utilisée titrait 2 970 UF par mg N et avait été adsorbée sur alun à une concentration finale de 6 pour 1 000.

La figure 14 montre le schéma des injections et celui de la formation des anticorps. On voit que la remontée des anticorps chez le cheval 1451 ne se produit pas immédiatement après une nouvelle injection, il y a souvent une baisse préalable; le taux d'anticorps final reste faible.

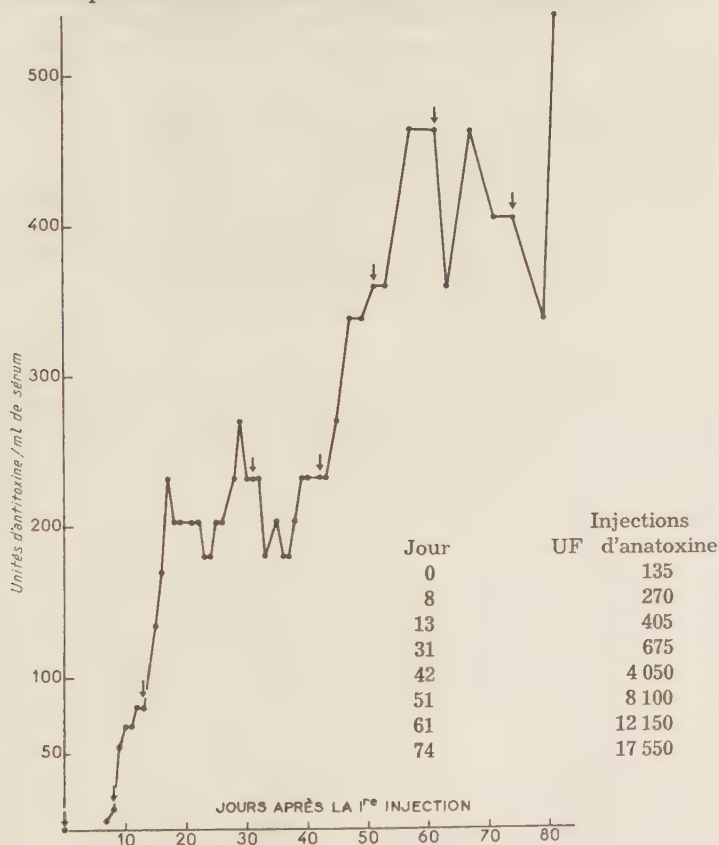
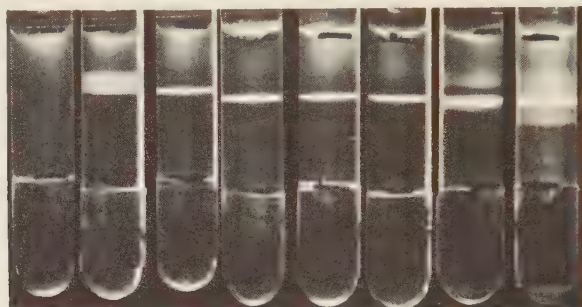


FIGURE 14. Formation d'anticorps chez le cheval 1451

La figure 15 met en évidence la formation des anticorps par la technique de précipitation spécifique en gel. On remarquera que pendant toute la première période, l'antitoxine est le seul anticorps détectable; vers la fin de l'hyperimmunisation, il y a quatre nouveaux anticorps qui se sont donc formés à la suite des injections d'anatoxine en quantité croissante contenant des impuretés en faible concentration.



Saignée du 7°, 13°, 15°, 18°, 30°, 43°, 63°, 82° jour.

FIGURE 15. Complexité des sérums prélevés à des dates variables au cours de l'hyperimmunisation du cheval 1451, démontrée par la technique de double diffusion en gélose. Couche inférieure: solution de toxine brute (M) gélosée; concentration 150 UF/ml. Couche intermédiaire: gélose simple. Le sérum dilué au demi et non gélosé a été ajouté au-dessus de la couche de gélose. Seules les deux couches inférieures ont été représentées.

TABLEAU 8. Hyperimmunisation des chevaux n^{os} 339, 341, 342, 344

Jours après la 1 ^{re} injection	UF injectées	Cheval 339 UF/ml sérum	Cheval 341 UF/ml sérum	Cheval 342 UF/ml sérum	Cheval 344 UF/ml sérum
0	149				
2		0	0	0	0
4	297			0	
6		0	54	0	0
8	446	0	162	0	0
10		13,5	205	13,5	27
13	743	27	205	40,5	67,5
15		27	205	40,5	81
17	1 485	27	205	27	115
21	2 970	40,5	284	27	115
24	4 460	27	243	20	
29	6 680	27	1 175	47	405
34	9 650	67,5	1 013	34	675
38			1 100		675

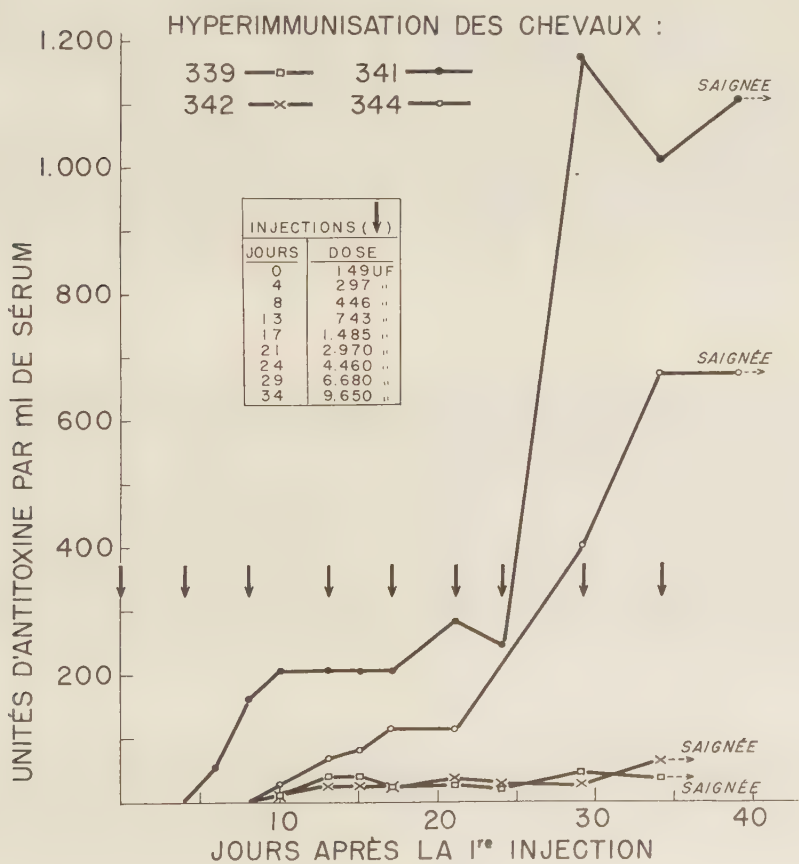
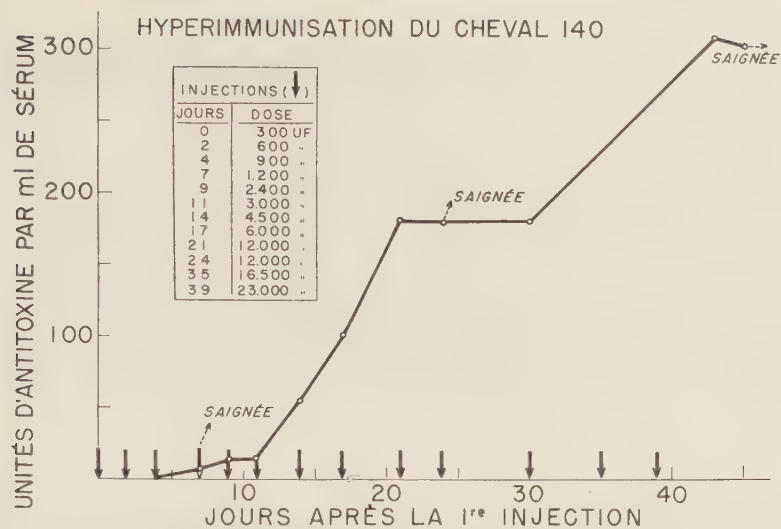


FIGURE 16

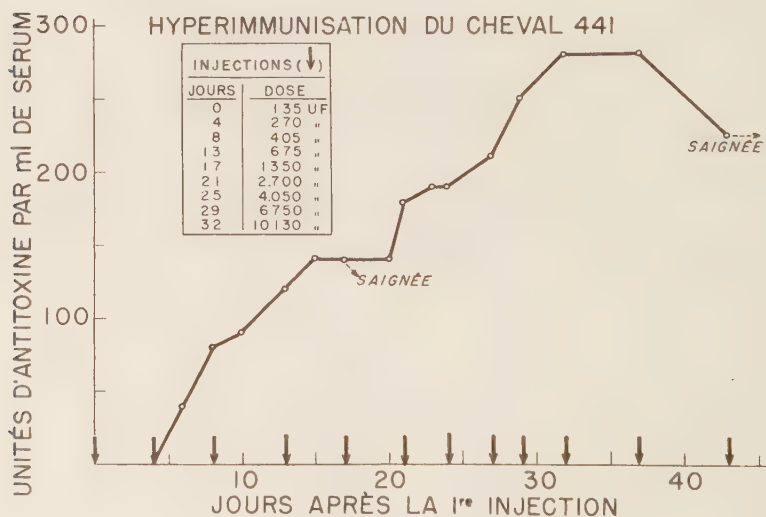
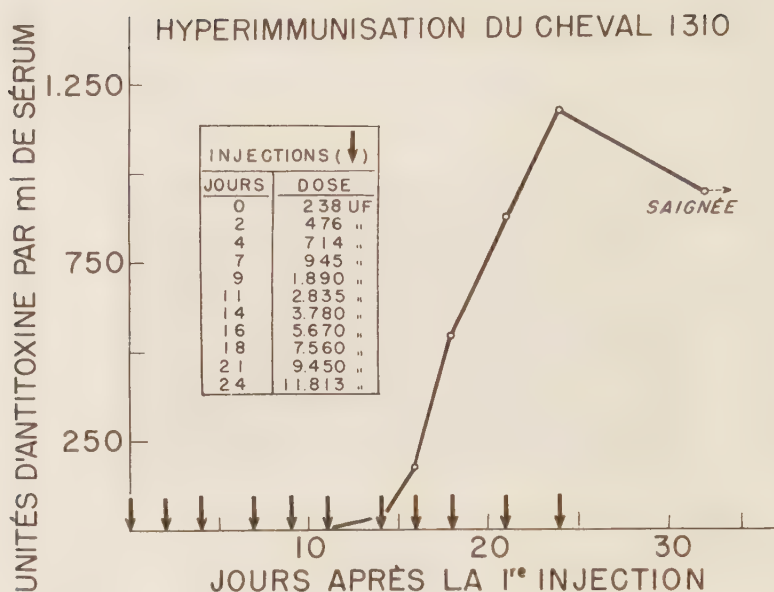


FIGURE 16 (suite)

Nous avons adopté un mode d'immunisation plus rapide, à raison de deux injections par semaine, rythme d'ailleurs utilisé par l'Institut Pasteur pour les chevaux produisant du sérum antidiphtérique. Nous avons hyperimmunisé quatre chevaux (n^{os} 339, 341, 342 et 344) dans les mêmes conditions avec de l'anatoxine titrant

2 700 UF/mg N adsorbée sur alun. Or, loin d'être identique, la formation des anticorps est différente chez ces quatre chevaux.

Deux chevaux (n^{os} 341 et 344) répondent surtout à l'anatoxine comme le montre l'évolution du taux d'antitoxine. Les deux autres (n^{os} 339 et 342) ne produisent presque pas d'anticorps antitoxiques (Fig. 16, tableau 8). La précipitation en gel (Fig. 17) confirme que les deux premiers chevaux ont surtout répondu à l'anatoxine; au contraire, les deux autres chevaux ont surtout répondu aux autres antigènes, lesquels accompagnent même en faible concentration, l'anatoxine utilisée pour l'hyperimmunisation.

Par contre, le cheval n^o 1310, hyperimmunisé avec une anatoxine titrant seulement 1 180 UF/mg N et contenant de nombreux antigènes (au moins 8 à 10) réagit surtout à l'anatoxine proprement dite. Le titre obtenu est élevé : 945 UF/ml, il y a peu d'anticorps annexes (Fig. 16).

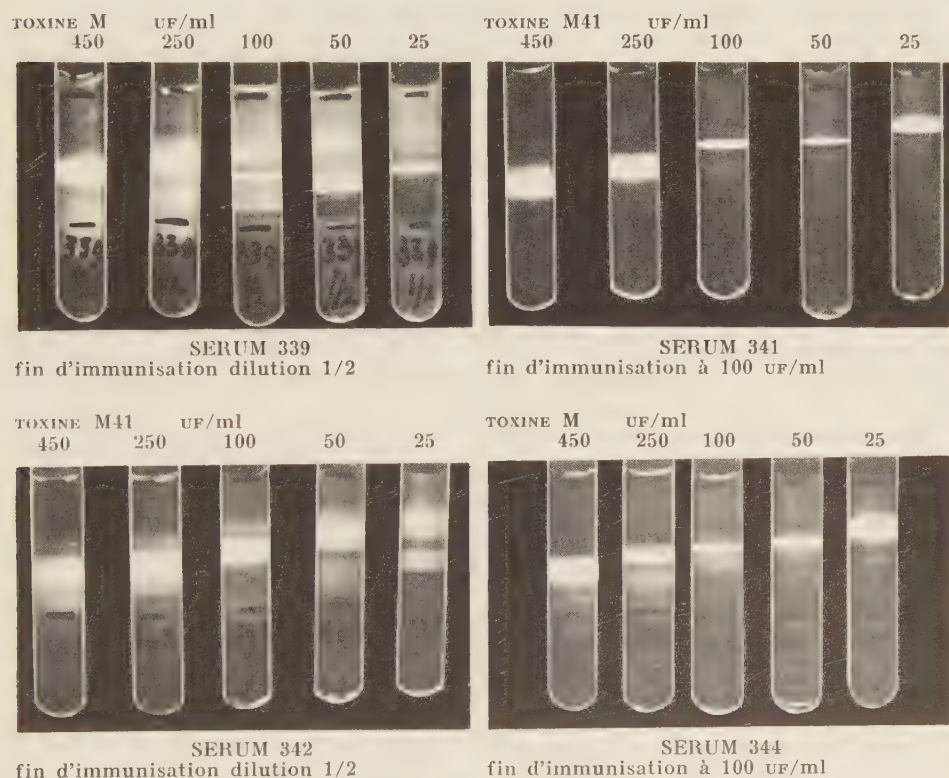


FIGURE 17. Mise en évidence de la complexité des anticorps présents dans les saignées des chevaux 339, 341, 342 et 344 en fin d'hyperimmunisation par la technique de double diffusion en gélose. Couche inférieure : sérum gélifié. Couche intermédiaire : gélose simple. La toxine brute concentrée (M) a été ajoutée à diverses concentrations au-dessus de la couche de gélose. Seules les deux couches inférieures ont été représentées.

Le sérum 441, préparé à partir d'une anatoxine très pure (3 000 UF/mg N) contient trois anticorps dès le début de l'hyperimmunisation et le titre obtenu reste faible : 225 UF/ml (Fig. 16).

On voit d'après ces résultats que la présence de très faibles quantités d'impuretés peut amener la formation d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces antigènes. La façon dont le cheval réagit est aussi importante que la pureté de l'antigène employé. Certains chevaux qui répondent tout de suite à l'anatoxine, donnent seulement de l'antitoxine pendant la période de début de l'hyperimmunisation et on peut obtenir des sérums à une zone en les saignant à cette phase (par exemple le cheval n° 1451, cf. Fig. 15).

Nous avons essayé d'interpréter ces résultats : Tous les chevaux utilisés étaient à Schick négatif; l'hyperimmunisation est donc toujours à considérer comme une injection de rappel. Ne doit-on pas en conclure que ces chevaux ont également une immunité de base vis-à-vis des antigènes qui accompagnent l'anatoxine diphtérique ?

La façon dont réagit un animal ne dépend donc pas seulement de l'antigène utilisé; les impuretés présentes même en faible concentration peuvent donner naissance à une forte production d'anticorps dirigés contre elles, en fonction de l'immunité de base de l'animal, obtenue lors de son premier contact avec le bacille diphtérique. Il faut également tenir compte du pouvoir antigénique absolu des impuretés, comparé à celui de l'anatoxine. Ce phénomène explique probablement aussi les différences de titre obtenues chez les chevaux destinés à une production commerciale de sérum. La figure 18 montre le nombre d'anticorps présents dans deux de ces sérums, le 906 et le 1 609, ainsi que dans le sérum-étalon de floculation de Copenhague.

Une étude qui confirme nos résultats fut celle de Barr et Llewellyn-Jones (12, 13, 14) sur l'immunisation par des antigènes associés; les facteurs à considérer sont les proportions des antigènes les quantités injectées et la présence d'immunité de base. Si l'animal a une immunité de base vis-à-vis de l'un des antigènes présents, la production d'anticorps envers les autres sera moindre.

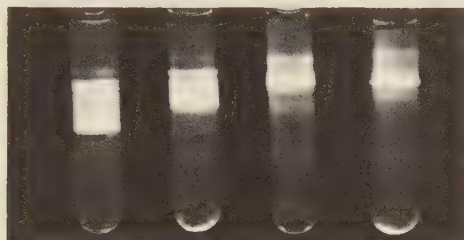
Deux injections d'anatoxine tétanique en présence d'autres antigènes n'amènent pas la formation normale des anticorps antitétaniques, si l'animal a déjà une immunité contre l'un des antigènes annexes. Les résultats sont les mêmes si la première injection vaccinante est faite avec un vaccin associé et la deuxième avec l'anatoxine tétanique seule; mais il n'en est pas de même si l'on fait l'inverse et que la première injection ne contienne que de l'anatoxine seule. L'échec est dû à la réponse secondaire envers l'autre antigène présent dans le vaccin, et qui peut être, entre autres, l'anatoxine diphtérique ou le vaccin antityphoparatyphoïdique A et B. L'étude a également porté sur des injections successives : le résultat dépend surtout du temps écoulé entre les injections. La formation d'anticorps antitétaniques est supprimée si l'on effectue les injections vaccinnantes dans une période comprise entre 3 et 28 jours après un rappel antidiphtérique.

Nous signalons aussi les résultats obtenus dans les études sur la double vaccination contre la diphtérie et la scarlatine (86). Un excès de toxine de la scarlatine supprime le pouvoir immunisant de l'antigène diphtérique.

Adler (2) étudia la compétition antigénique chez le cobaye. La formation d'anticorps antiglobulines de lapin est diminuée si en même temps il y a formation d'anticorps antithémocyanine. Il est également démontré que ce ne sont pas uniquement les

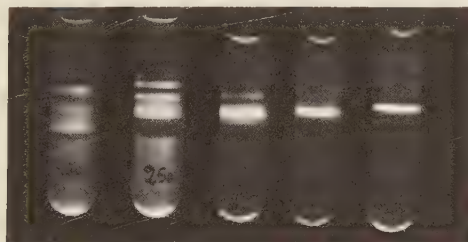
rapports des deux antigènes, mais surtout l'existence d'une immunité de base chez l'animal, qui détermine la formation des anticorps spécifiques. Une quantité d'hémocyanine sans influence sur la formation d'antiglobulines chez des animaux non

M à : 450 250 100 50 UF/ml



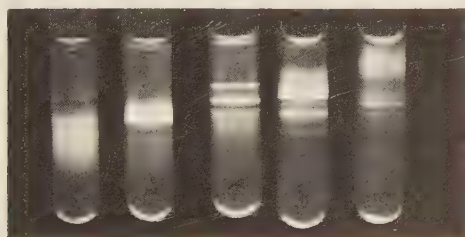
Etalon de floc. de Cop. à 100 UF/ml

M à : 450 250 100 50 25 UF/ml



Sérum complexe N° 1609 à 100 UF/ml

U à : 500 250 100 50 25 UF/ml



Sérum complexe N° 906 à 100 UF/ml

FIGURE 18. Mise en évidence du nombre d'anticorps présents dans trois préparations de sérums antidiphthériques: l'étalon de floculation de Copenhague et deux préparations commerciales, n°s 906 et 1609. Technique employée: double diffusion en gélose. Couche inférieure: sérum gélosé à 100 UF/ml. Couche intermédiaire: gélose simple. La toxine brute concentrée (M ou U) a été ajoutée à diverses concentrations au-dessus de la couche gélosée. Seules les deux couches inférieures ont été représentées.

sensibilisés, supprime la formation d'antiglobulines chez des animaux sensibilisés, et vice-versa.

Des résultats comparables furent obtenus par Abramoff et Wolff (1) dans une étude quantitative sur l'effet de l'injection simultanée de deux antigènes.

Rappelons les difficultés rencontrées pour la préparation de sérums anti-sérum normal humain et anti-sérum normal de cheval, destinée à être utilisés dans l'immuno-électrophorèse. Nous n'avons pratiquement jamais obtenu des sérums directement utilisables et nous avons toujours eu recours aux mélanges d'anti-sérums obtenus soit par hyperimmunisation avec du sérum total, soit par utilisation des diverses fractions sanguines. N'est-il pas possible d'expliquer les échecs obtenus avec des animaux à Schick positif ?

TABLEAU 9. Caractères comparatifs des sérums des chevaux n^{os} 339, 341, 342, 344

Cheval	Saignée	Titre flocul.	L ₊ /ml	Rapport L ₊ /L _t	mg N/ml	Nombre d'anneaux	Nature des anticorps β-2 γ	
339	34 ^e j	67,5	50	0,74	16,1	> 5		
341	11 ^e j	150	205	1,37	13,7	1(+2)	+	+++
341	38 ^e j	1 100	1 000	0,91	16,1	1(+2)	+++	+
342	34 ^e j	34	35	1	13,5	> 5		
344	38 ^e j	675	850	1,25	15,1	3	++	++

TABLEAU 10. Caractères des toxines employées pour l'hyperimmunisation des chevaux

Chevaux immunisés	Résultats réaction de Schick	UF/mg N Toxine	Nombre de constituants	Adjuvants	Remarques
1 310	Négatif	1 180	N ^a	Alun	
1 451	Négatif	2 970	4 à 6	Alun	
339	Négatif	2 700	4 à 6	Alun	
341	Négatif	2 700	4 à 6	Alun	
342	Négatif	2 700	4 à 6	Alun	
344	Négatif	2 700	4 à 6	Alun	
140	Négatif	2 520	6 à 8	Alun	
441	Négatif	3 000	1 (2)	Alun	
824	Positif	3 000	1 (2)	Ca Phosphate	
825	Positif	3 000	1 (2)	Ca Phosphate	du 1 ^{er}
854	Positif	3 000	1 (2)	Ca Phosphate	au 21 ^e ou
859	Positif	3 000	1 (2)	Ca Phosphate	au 31 ^e jour
824	Positif	brute	N ^a	Alun	
825	Positif	brute	N ^a	Alun	du 45 ^e au
854	Positif	brute	N ^a	Alun	dernier jour
859	Positif	brute	N ^a	Alun	

^a. Le nombre d'antigènes est élevé (au moins 10).

TABLEAU 11. Caractères des sérums d'origines diverses

Origine des sérums	Titre flocul.	L ₊	L ₊ /L _f	mg	N/ml	Nombre d'anneaux	Nature des anticorps β-2 γ		Remar- ques
906 sérum commerc. Inst. Pasteur	1 700	1 500	0,88	17,5	N		++++		sérum digéré
Copenhague étalon antitoxique dil. à	200	200	1	1,46	N		++++	±	
Copenhague étalon de floculation	500	500	1	3,79	N		+++	+	
Pappenheimer 1520-5353 A dil. à	200	175	0,875	0,92	2		++++		sérum digéré

Les antitoxines utilisées pour la préparation des sérums n'étaient jamais purifiées. Comparons deux séries de chevaux, les uns à Schick négatif, les autres à Schick positif. On trouve encore chez les premiers, même en faible concentration, des anticorps antidiphthériques en circulation. Le rappel avec une anatoxine brute amène donc toujours la production d'anticorps antitoxiques. Même si les titres obtenus varient avec les animaux, comme nous l'avons vu, les titres moyens resteront élevés, car il y a toujours d'excellents producteurs d'anticorps dans chaque groupe de chevaux.

Examinons maintenant le cas des chevaux à Schick positif. L'hyperimmunisation avec de l'anatoxine brute doit être considérée à leur égard comme une injection de plusieurs antigènes. L'anatoxine étant présente en faible concentration, il est peu probable que ces animaux neufs produisent de préférence des anticorps antitoxiques et pas (ou peu) d'anticorps dirigés contre les autres antigènes. C'est au contraire l'inverse qui est le plus plausible et nous fournit une explication à la faiblesse des titres floculants obtenus avec ces animaux. Comment alors obtenir des anticorps antidiphthériques à titre élevé avec des chevaux à Schick positif ? L'utilisation d'anatoxines *purifiées* nous a semblé être la solution toute indiquée. Il faudrait injecter à des animaux sans immunité de base des préparations de haute pureté. La présence de cette forte concentration d'anatoxine provoquera avec la plus grande probabilité la formation d'anticorps antitoxiques.

4. L'HYPERIMMUNISATION DES CHEVAUX SANS IMMUNITÉ DE BASE, AVEC L'ANATOXINE PURIFIÉE

La figure 19 montre les résultats obtenus avec 4 chevaux sans immunité de base. Nous voyons que la montée des titres chez ces chevaux est beaucoup plus lente que chez des chevaux à Schick négatif et que les titres obtenus n'atteignent pas des valeurs élevées. Néanmoins, tous les chevaux donnent tous naissance à l'antitoxine et nous n'avons pas, comme c'est le cas avec des chevaux à Schick négatif, des animaux qui ne forment pas d'anticorps antitoxiques.

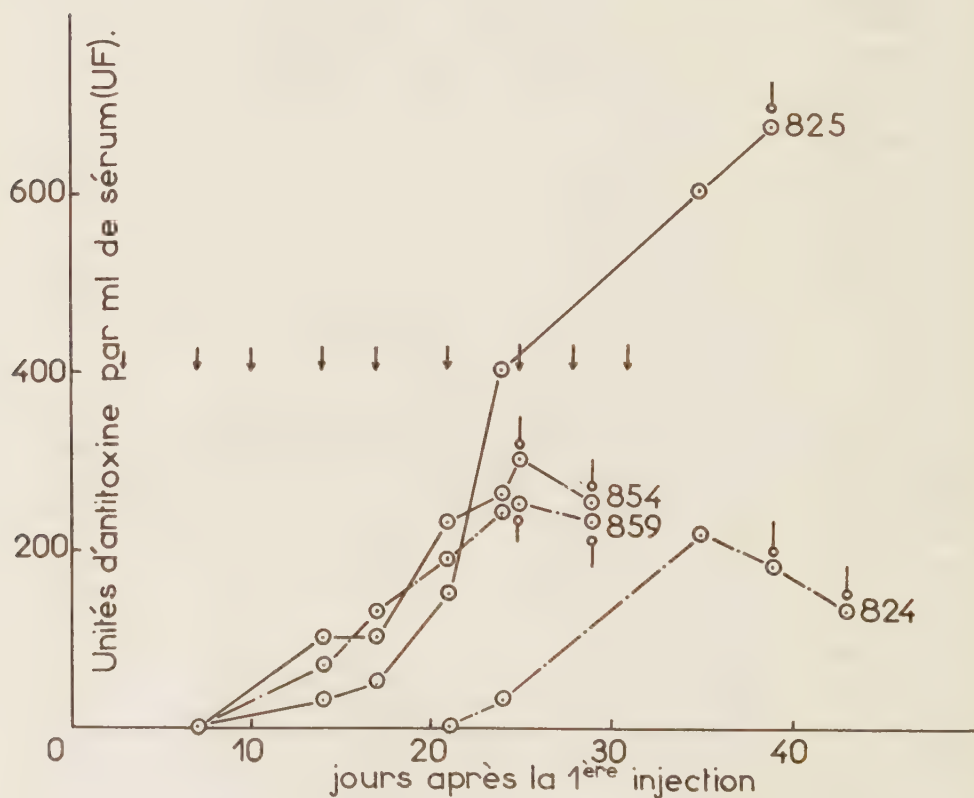


FIGURE 19. Hyperimmunisation des chevaux à Schick positif 824, 825, 854, 859.
 ↓ injection; ○ saignées d'essai; ⊥ grandes saignées.

Nous avons également étudié chez des chevaux la formation d'anticorps vis-à-vis des impuretés. Nous avons voulu voir si les chevaux, en pleine phase de production d'anticorps antitoxine diphtérique, continuent à former de préférence ces anticorps, quand on leur injecte de l'anatoxine brute, ou au contraire donnent aussi des anti-

corps annexes et dans ce cas, s'il y a une baisse dans le titre antitoxique. Pendant toute la première période, la technique de précipitation spécifique en gel montre que la quantité d'anticorps annexes non antitoxiques reste faible; il y a, outre la ligne antitoxine, une ou deux lignes provenant des anticorps annexes. Ces lignes sont très faibles (voir tableau 12). L'injection de la toxine brute provoque immédiatement la formation de plusieurs autres anticorps et même une baisse du titre (chevaux 825 et 854). Il est donc ainsi confirmé qu'on a tout intérêt à utiliser des préparations aussi pures que possible pendant toute l'hyperimmunisation.

TABLEAU 12. — Caractères de diverses saignées effectuées chez des chevaux à Schick positif, au cours de l'hyperimmunisation

Cheval	Saignée du (jour)	Titre flocul.	L_{+}/ml	Rapport L_{+}/L_f	mg N/ml	Nombre d'anneaux	Nature des anticorps β_2 γ	
824	39	180	20	0,11	13	2	+++	+
824	43	130	50	0,38	11,7		+++	+
824	67	320	170	0,53	15,3	5	+++	+
824	71	230	130	0,57	13,8	5	+++	+
824	95	550	450	0,82	16,3	8	++++	±
824	99	380	300	0,79	14,2	8	++++	±
825	39	670	210	0,32	14,1	2	++(+)	++
825	60	400	270	0,68	14,1	4	+++	+
825	64	320	170	0,53	13,5	4	+++	+
825	95	300	225	0,75	17,5	7	++++	±
825	99	240	175	0,73	14,7	7	++++	±
854	25	300	115	0,38	12,1	3	++	++
854	29	250	90	0,36	11,5	3	++	++
854	60	600	525	0,88	12,5	4	+++	++(+)
854	64	560	425	0,76	13,4	4	+++	++(+)
854	95	350	350	1	16,2	8	+++	+
854	99	330	275	0,84	14,8	8	+++	+
859	25	250	90	0,36	13,7	3	++(+)	++
859	29	230	50	0,22	10,8	3	++(+)	++
859	60	300	175	0,59	14,8	4	+++	+
859	64	230	175	0,76	13,4	4	+++	+
859	95	250	175	0,70	14	7	++++	(±)
859	99	180	125	0,70	14,4	7	++++	(±)

5. ÉTUDE DE LA MOBILITÉ ÉLECTROPORÉTIQUE DES ANTICORPS FORMÉS PENDANT L'HYPERIMMUNISATION COMPARÉE A LEURS VALEURS *IN VIVO* / *IN VITRO*

Nous avons également étudié les modifications qui se sont produites chez les anticorps antitoxiques au cours de l'hyperimmunisation.

Glenny *et al.* (84) trouvèrent déjà en 1925 que le rapport *in vivo/in vitro* est plus élevé dans les saignées de début d'immunisation et ils décrirèrent un sérum ayant un rapport égal à 3. Barr et Glenny (10) montrèrent que ce sont les fractions globuliniques les moins solubles qui ont les rapports les plus élevés et préparèrent des fractions ayant un rapport *in vivo/in vitro* égale à 18,9 (11). Mörch (176) établit aussi que l'antitoxine n'est pas toujours présente dans la même fraction sérique. Il précipita l'anticorps avec du sulfate d'ammonium; dans certains cas, la plus grande partie de l'antitoxine précipita entre 25 et 33 % de saturation en sulfate d'ammonium et se trouva donc être présente dans la fraction des euglobulines; dans d'autres cas, l'antitoxine précipita surtout entre 40 et 50 % de saturation en sulfate d'ammonium et se trouva donc être présente dans la fraction des pseudo-globulines. Entre ces deux cas, il y eut plusieurs moyens termes, par exemple on trouva partout de l'antitoxine entre 25 et 50 % de saturation. L'auteur signala également que les fractions obtenues avec les plus faibles quantités de sulfate d'ammonium flocculent plus rapidement que les autres.

Ces travaux furent repris par Keckwick et Record (125) qui démontrèrent l'existence de deux types d'antitoxines, les unes associées aux β -2 et les autres aux γ -globulines. Les rapports *in vivo/in vitro* de ces deux types d'antitoxines sont différents. Les antitoxines avec la mobilité électrophorétique des γ -globulines ont un rapport *in vivo/in vitro* d'environ 2, tandis que les antitoxines avec une mobilité des β -2-globulines ont un rapport voisin de 0,8. Ce sont les γ -globulines qui flocculent le plus vite et se forment au début de l'immunisation. Si l'on compare les quantités absolues de γ - et β -antitoxines formées pendant l'hyperimmunisation, on trouve que les anticorps γ -globulines se forment plus vite mais que leur titre reste plus bas, alors que les titres des anticorps associés aux β -globulines montent plus lentement mais atteignent des valeurs absolues plus élevées.

Les résultats thérapeutiques obtenus par McSweeney (159) dans le traitement des cas suraigus furent probablement dus à la teneur élevée en γ -globulines des antitoxines utilisées. Levine (143) qui a repris ces travaux et comparé les fractions obtenues entre 0 et 30 % et entre 30 et 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, n'a pas trouvé de différence dans les rapports *in vivo/in vitro* de ces fractions.

Nous avons comparé les rapports *in vivo/in vitro* des sérums au cours de l'hyperimmunisation, ainsi que la mobilité des anticorps¹. Diverses éventualités peuvent se produire (tableau 13) :

1. Nous avons adopté la terminologie suivante. — Nous appelons les γ -globulines ordinaires lentes, γ -globulines, sans indication supplémentaire. Le constituant intermédiaire entre les γ - et les β -2-globulines qui apparaît chez les chevaux hyperimmunisés (292), est appelé β -2-globuline, d'après Keckwick (125, 126) et Cinader (44, 45). Il est identique au constituant T de van der Scheer (266, 267, 268). D'autres auteurs appellent les γ -globulines lentes, γ -2-globulines et les β -2-globulines, γ -1-globulines (58). Avec Boyd (31), il faut considérer que β -2 = T = γ -1.

TABLEAU 13. Caractères de diverses saignées effectuées chez les chevaux à Schick négatif, au cours de l'hyperimmunisation.

Cheval	Saignée	Titre flocul.	L ₊ /ml	Rapport L ₊ /L _f	mg N/ml	Nombre d'anneaux	Nature des anticorps	
							β-2	γ
1310	14 ^e j	30	15	0,5	11	2	++++	±
1310	16 ^e j	180	120	0,66	10,5	3	++++	±
1310	32 ^e j	945	550	0,58	13,4	4	++++	±
441	6 ^e j	40	80	2	10,7	1	+	+++
441	17 ^e j	140	405	2,9	11,85	3	+	+++
441	43 ^e j	225	425	1,89	13,2	3	++	++(+)
140	7 ^e j	6,75	6	0,89	12,7	(1)	(+)	
140	24 ^e j	180	150	0,83	14	5	++	++
140	45 ^e j	304	225	0,73	14,4	5	+++	+
1451	11 ^e j	67,5	55	0,82	11,5	1	+++	+
1451	M ^a	202	325	1,60	11,1	1	+	+++
1451	82 ^e j	540	480	0,89	12	5	++++	±

^a. Mélange des sérums prélevés entre le douzième et le quarante-troisième jour.

a) Certains chevaux répondent dès le début de l'hyperimmunisation par la formation d'antitoxines ayant un rapport *in vivo/in vitro* inférieur à 1. Le rapport de ces sérums reste inférieur à 1, par exemple : sérum 1310.

b) Chez d'autres chevaux, le rapport L₊/L_f est inférieur à 1, tout à fait au début de l'hyperimmunisation; par la suite il est supérieur à 1, puis à nouveau inférieur à 1 (par exemple sérum 1451).

c) D'autres chevaux enfin répondent dès les premières injections vaccinales par la formation d'anticorps ayant un rapport *in vivo/in vitro* supérieur à 1 et continuent à produire des antitoxines avec un rapport supérieur à 1.

Il faut noter que les titres des anticorps en unités floculantes ne sont jamais élevés pour les sérums ayant un rapport *in vivo/in vitro* supérieur à 1.

Nous avons fait les immuno-électrophorèses de ces divers sérums. Les résultats montrent que les mobilités électrophorétiques des anticorps peuvent être associées à celles des γ et des β-2-globulines (fig. 20).

Les sérums de chevaux à Schick négatif, ayant un rapport *in vivo/in vitro* inférieur à 1, présentent toujours des β-2 globulines, tandis que la présence des γ-globulines amène une augmentation de ce rapport. La valeur la plus élevée est de 2,90; elle est obtenue pour le sérum 441 au 17^e jour. L'immuno-électrophorèse montre même dans ce cas la présence des β-2-globulines antitoxiques. Nous verrons plus loin qu'il est possible d'obtenir par précipitations fractionnées, des préparations contenant presque uniquement des γ-globulines. Ces résultats ne sont valables que dans les cas où l'hyperimmunisation a été effectuée chez des chevaux ayant une immunité de base.

L'hyperimmunisation des chevaux sans immunité de base (824, 825, 854 et 859) montre que tous ces chevaux donnent dans les premiers stades de l'hyperimmunisation, des antitoxines de type γ et β -2 et des rapports L+/Lf très bas, compris entre 0,11 et 0,38 (tableau 12, fig. 21). Au cours de l'hyperimmunisation, les valeurs

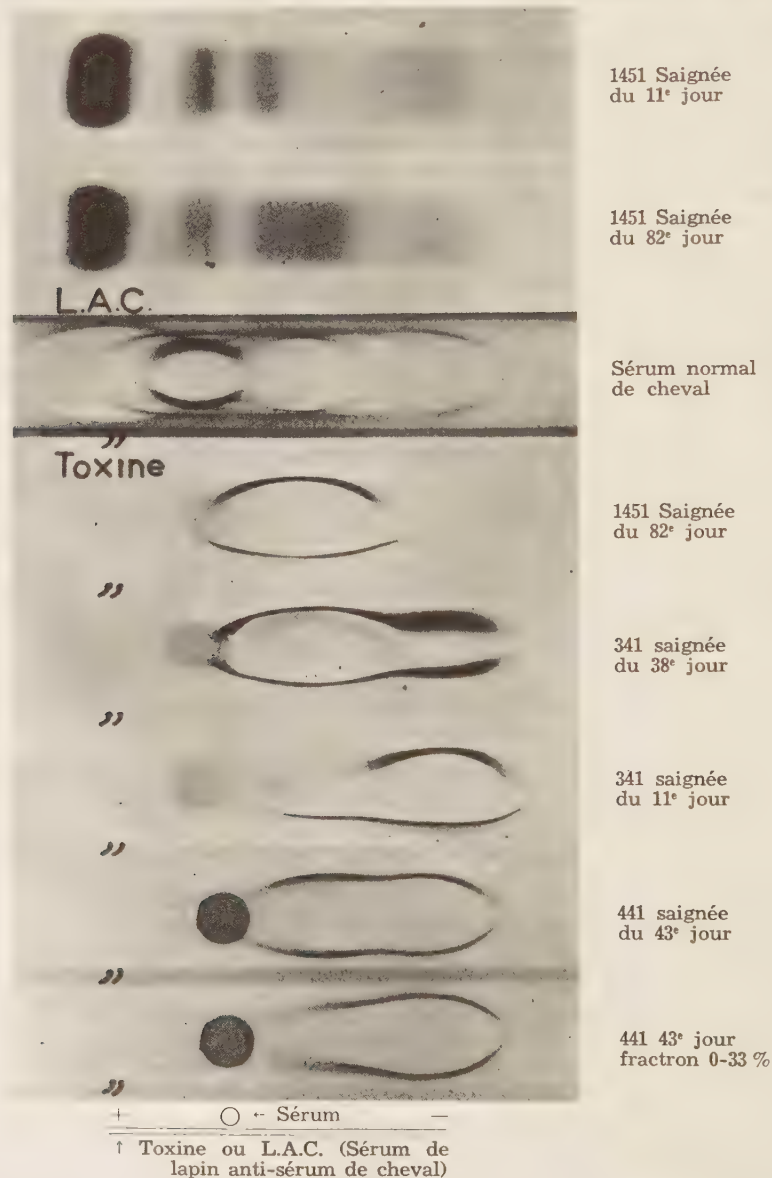


FIGURE 20. Etude de la mobilité électrophorétique de l'antitoxine antidiphtérique par la technique d'immuno-électrophorèse.

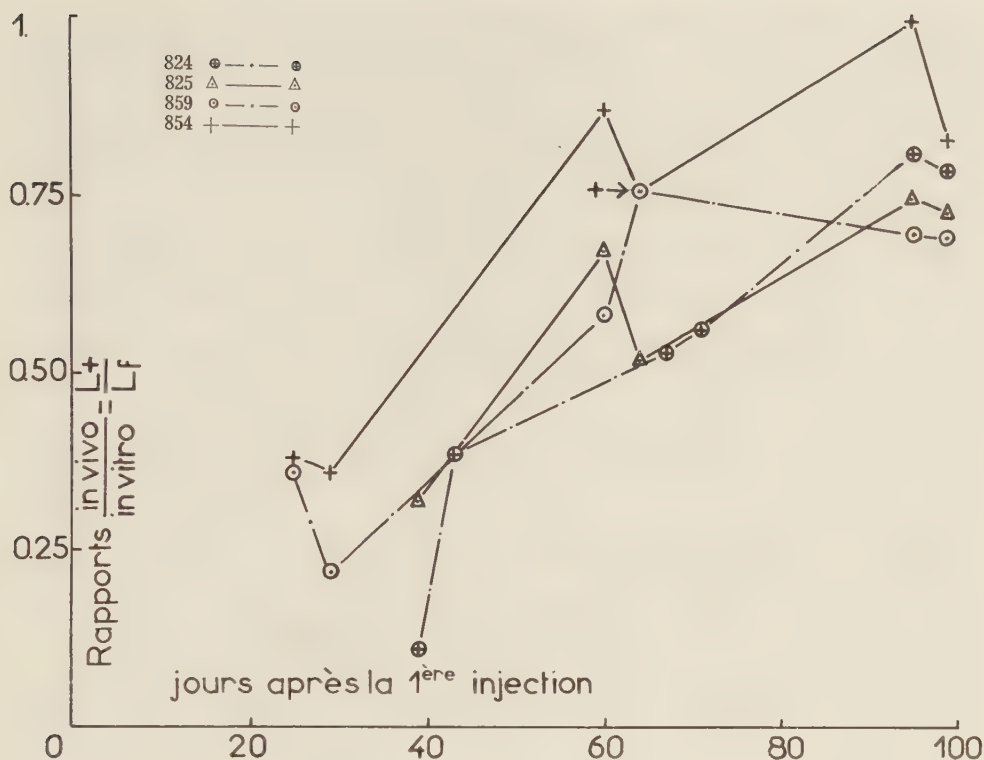


FIGURE 21. Rapports *in vivo*/*in vitro* pendant l'hyperimmunisation des chevaux à Schick positif.

augmentent mais sans jamais atteindre les valeurs élevées rencontrées chez des chevaux ayant une immunité de base. Les propriétés neutralisantes et flocculantes n'évoluent pas de façon parallèle; on doit donc admettre qu'elles sont chacune conditionnées par des groupes antigènes déterminants, différemment situés sur la molécule de toxine.

6. RÉSULTATS DE L'HYPERIMMUNISATION DE LAPINS AVEC L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE PURIFIÉE

Nous avons vu que la formation d'anticorps avec une mobilité de γ -globulines précède souvent chez le cheval celle d'anticorps avec une mobilité de β -2-globulines. Les anticorps chez le lapin, formés durant l'immunisation, ont été toujours trouvés associés aux γ -globulines. Nous avons voulu contrôler ce fait par la technique de l'immuno-électrophorèse et voir si, lorsque l'on continue l'immunisation suffisamment longtemps avec de fortes doses d'anatoxine, ces animaux ne finissent pas également par former des anticorps avec une mobilité de β -2-globulines. Nous nous sommes basés sur les résultats obtenus chez les chevaux d'après lesquels

nous avons établi notre mode d'immunisation, en tenant compte de la différence de poids de ces animaux. Nous avons également administré par voie bucale de l'acide ascorbique aux animaux durant l'immunisation, l'effet favorable de cette vitamine sur la production d'anticorps ayant été démontré (156).

Le tableau 14 montre le schéma des injections faites par voie intramusculaire. La toxine titrant 3 000 UF/mg N était adsorbée sur phosphate de calcium. Il n'a pas été possible de détecter chez ces animaux des antitoxines avec une mobilité de β -2-globulines.

Durant toute l'immunisation, les anticorps formés ont une mobilité de γ -globulines. Le rapport L_+/L_f du mélange des trois sérums L5-D, titrant 60 UF/ml, était de 0,915, ce mélange présentait, outre l'antitoxine, deux anticorps annexes.

TABLEAU 14. Hyperimmunisation de lapins avec l'anatoxine diphtérique absorbée sur phosphate de calcium

a	0	6	10	14	19	22	26	29	32	37	39	43
b	3	6	12	24	30	45	60	75	120	150	250	500

a. Nombre de jours après la première injection.

b. UF injectées.

Résultats des saignées du 50^e jour :

1^{er} lapin : 75 UF/ml — K_f : 2' — 10,5 mg N/ml
 2^e » : 60 UF/ml — K_f : 1' — 11,5 mg N/ml
 3^e » : 45 UF/ml — K_f : 1' — 12,5 mg N/ml

Mélange des trois saignées :

60 UF/ml — K_f : 1' — 11,03 mg N/ml — L_+/L_f = 0,915
 L 5 D

7. DISCUSSION

La formation d'anticorps antitoxine diphtérique chez le cheval a été étudiée. Il a été démontré qu'il y a plusieurs facteurs à considérer :

a) *L'influence des impuretés présentes dans des préparations d'anatoxine.* — La pureté des préparations joue un rôle important dans l'obtention de sérums contenant uniquement l'antitoxine, car des impuretés présentes en quantité infime peuvent donner naissance à des anticorps dirigés contre elles. Il est même possible que la formation d'antitoxine reste faible tandis qu'il y a presque uniquement formation d'anticorps non antitoxiques. Le cas contraire se réalise en général et on peut conclure que l'utilisation des anatoxines purifiées a donné des préparations antitoxiques dans lesquelles les anticorps « accessoires » sont restés faibles, surtout si l'on compare ces préparations avec les sérums antidiphtériques obtenus par l'hyperimmunisation des chevaux avec l'anatoxine brute. Il est possible d'obtenir des préparations qui contiennent uniquement l'antitoxine; il suffit de suivre la production d'anticorps par la technique de diffusion en gélose et de saigner les animaux avant l'administration des fortes doses d'anatoxine dans lesquelles les impuretés présentes même à l'état de traces risquent d'amener la formation d'anticorps accessoires.

b) *La mobilité électrophorétique des anticorps.* — Les anticorps formés chez les chevaux sont associés aux fractions sanguines qui ont une mobilité de γ -globulines et une mobilité de β -2-globulines. En général, la formation des γ -anticorps précède celle des β -2, mais la quantité totale formée reste faible, alors que la formation des anticorps β -2 se fait avec retard mais atteint des titres beaucoup plus élevés. Néanmoins, ceci n'est pas une règle absolue, car dans certains cas, les animaux forment dès le début de l'hyperimmunisation, des anticorps β -2 et presque pas d'anticorps γ , et nous avons rencontré un cas (cheval n° 441) où, durant toute l'hyperimmunisation, on notait la présence d'une quantité élevée d'anticorps avec une mobilité de γ -globulines.

c) *Les rapports in vivo/in vitro.* — Nous avons d'abord eu l'impression que les rapports *in vivo/in vitro* élevés étaient associés à la présence de γ -antitoxines dans les immun-sérums, comme l'ont signalé certains auteurs (125). Notre point de vue était basé sur le fait que dans tous les cas étudiés, les rapports élevés se rencontraient au début de l'hyperimmunisation et qu'alors, les β -2 antitoxines se trouvaient en faible quantité. Dans les cas où il y avait formation de globulines β -2 au début de l'hyperimmunisation, les rapports *in vivo/in vitro* étaient faibles (voir chevaux 1310 et 1451).

L'emploi de chevaux sans immunité de base a démontré que même les chevaux ayant dès le début de l'hyperimmunisation des quantités élevées de γ -antitoxines présentaient des rapports *in vivo/in vitro* très bas. Il est donc également possible d'avoir des γ -antitoxines avec un rapport *in vivo/in vitro* très bas.

A la suite de ces expériences, nous avons réexaminé les diverses antitoxines obtenues chez les chevaux ayant une immunité de base. L'immuno-électrophorèse ne permet pas une mesure quantitative exacte des anticorps présents. Il est cependant possible d'avoir une idée de leur quantité si l'on fait la détection avec plusieurs concentrations de toxine, ce qui permet de voir pour quelles concentrations les lignes de précipitation spécifique sont à l'équivalence de la réaction antigène-anticorps. Si nous comparons à cet égard quelques-uns de ces anti-sérums préparés, nous constatons que : 1) Le sérum 341 au début de l'hyperimmunisation (saignée du 11^e jour) ne contient pratiquement pas de β -2 antitoxines; il a une valeur $L+/Lf = 1,37$, tandis que le sérum 441 à la fin de l'hyperimmunisation (saignée du 43^e jour) contient une quantité élevée de β -2 antitoxines et son rapport $L+/Lf$ est égal à 1,89; 2) Le sérum 341 fin de l'hyperimmunisation (saignée du 38^e jour) contient presque uniquement des anticorps β -2 et a un rapport $L+/Lf = 0,91$. Le changement γ - β -2 aurait dû amener un changement du rapport $L+/Lf$ beaucoup plus important que les valeurs 1,37 et 0,91 trouvées; 3) Le sérum 140 présente au début de l'hyperimmunisation une quantité élevée de γ -antitoxines, tandis que le rapport est seulement de 0,83. Compte tenu de la quantité de γ -antitoxines, cette valeur serait donc beaucoup trop basse.

L'explication de ces discordances fut donnée par les études faites avec les toxines digérées. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le chapitre VII. Il sera démontré qu'il y a divers anticorps dirigés contre un des motifs antigéniques de la toxine. L'anticorps floculant et l'anticorps neutralisant ne sont pas les mêmes. Ce fait nous permet d'expliquer les divergences trouvées dans les valeurs *in vivo/in vitro*. Ces faits impliquent donc qu'il doit être possible d'avoir des β -2 antitoxines avec un rapport $L+/Lf$ élevé et qui auront plus d'anticorps neutralisants que d'anticorps floculants.

Les sérums généralement étudiés ont toujours été des sérums de fin d'immunisation; ils ont donc toujours été à prédominance β -2; leur rapport *in vitro/in vivo* d'environ 1 est à considérer comme une valeur limite d'une hyperimmunisation avec les divers motifs antigéniques. Les anticorps β -2 que nous avons isolés même au début de l'hyperimmunisation n'ont pas présenté ce rapport élevé. Nous avons, pour avoir ce type d'antitoxines, suivi une autre voie et isolé les anticorps β -2 d'un cheval qui, pendant une longue période, a présenté un rapport $L+/Lf$ élevé, c'est-à-dire un animal qui a formé pendant cette période beaucoup d'anticorps antitoxiques et peu d'anticorps flocculants. Ces anticorps β -2 ont en effet donné un rapport élevé de titres *in vivo/in vitro* (1,75). Il a également été démontré que l'antitoxine formée par le lapin ayant la mobilité d'une γ -globuline, contient également les deux anticorps en quantités élevées.

Étude quantitative de la réaction toxine-antitoxine diphtériques

1. INTRODUCTION

La réaction de précipitation fut découverte par Kraus en 1897 (130). Il démontra que si l'on filtre des cultures de divers germes tels que les bacilles typhiques, cholériques ou pesteux et que l'on ajoute au filtrat une certaine quantité d'antisérum spécifique, on remarque, après séjour du mélange à 37°, la formation d'une opalescence devenant de plus en plus dense, donnant naissance à des flocons qui se déposent en laissant un surnageant clair. On n'obtient aucun précipité si, dans les mêmes conditions, on ajoute au filtrat de culture un antisérum non spécifique. Kraus appelait les anticorps donnant cette précipitation des « précipitines » et les antigènes qui avaient servi à leur production, des « précipitinogènes ». La même réaction se produit si, au lieu des antigènes en solution, ayant donc des dimensions moléculaires, on prend des antigènes qui se sont associés à des cellules comme les bactéries, les érythrocytes, etc.; dans ce cas, la réaction est désignée sous le nom « d'agglutination ». La différence entre la réaction de précipitation et l'agglutination tient donc à la dimension de l'antigène utilisé.

D'autres chercheurs (186, 190) démontrèrent, immédiatement après la découverte de Kraus, que cette réaction s'applique aux filtrats de culture de nombreux germes. Bordet et Tchistovitch préparèrent en 1899 des sérums précipitants à partir des protéines animales. Tchistovitch (290) immunisa des lapins, des cobayes, des chiens et d'autres animaux avec du sérum d'anguille. Ce sérum, produit fortement toxique, mélangé aux sérums des animaux immunisés, donna la réaction de précipitation. Le même résultat fut obtenu par Bordet (22) par l'immunisation de lapins avec du sérum de poule et vice-versa, ou par injection de lait aux lapins. Un sérum de lapin anti-ovalbumine, précipitant l'ovalbumine, fut décrit par Myers en 1900 (184, 185). La même année Jacoby (118) parla des phyto-précipitines, tout comme Kowarski en 1901 (129). Il est maintenant établi qu'on peut préparer des sérums spécifiques contre presque toutes les protéines ainsi que contre certains poly-saccharides et lipides, par immunisation d'animaux.

Au cours d'une maladie infectieuse, il y a souvent formation d'anticorps préci-

pitants. Les antigènes sont dans ce cas des protéines des germes. En conséquence, pendant un certain temps, l'application de la réaction de précipitation fut surtout limitée au diagnostic de diverses maladies, par exemple elle servit à dépister les chevaux morveux (170); le sérum de ces animaux contient un anticorps qui précipite les filtrats de culture de ce bacille; le suc splénique des animaux morts à la suite d'une infection charbonneuse contient un antigène qui précipite spécifiquement le sérum des animaux immunisés contre cette maladie (8). Il faut remarquer aussi qu'on peut trouver des anticorps précipitants dans le sérum de sujets atteints de maladies sériques ou chez ceux présentant une hypersensibilité, par exemple vis-à-vis de l'insuline et de la tuberculine (42).

Les applications de la réaction de précipitation sont nombreuses. Le classement suivant nous permettra de les traiter en détail :

a) La réaction de floculation; on distingue deux techniques, celle de Ramon et celle de Dean et Webb.

b) Les « réactions à l'anneau » formées à l'interface de deux couches liquides (Ring Test).

c) Les réactions de précipitation spécifique en gélose, avec leurs diverses applications : la précipitation spécifique en tube, technique de Oudin et technique Oakley et Fulthorpe; la précipitation spécifique en boîte de Pétri, technique de Ouchterlony; l'immuno-électrophorèse, technique de Grabar et Williams.

d) L'agglutination d'antigènes adsorbés sur particules non spécifiques.

2. LA FLOCCULATION

Cette réaction « in vitro » est surtout appliquée au titrage des toxines, de leurs dérivés atoxiques et des antitoxines. Nous donnerons quelques détails sur son développement historique.

En 1902, étudiant la réaction entre la ricine et l'antiricine, Danysz (55) remarqua que la précipitation se fait le plus rapidement dans les mélanges neutres. Le mélange ne précipite pas s'il y a un excès de ricine.

Calmette et Massol (41) étudièrent la précipitation du venin de cobra par l'antivenin. L'antivenin est préparé par immunisation des chevaux avec le venin. La précipitation se fait toujours au voisinage des doses optima. Il y a neutralisation des deux composants et il faut un certain temps de contact pour que cette précipitation puisse se manifester. On peut titrer la valeur antitoxique des sérums en mesurant leurs activités précipitantes.

La réaction de floculation, telle qu'elle s'applique au titrage de la toxine, de l'anatoxine et de l'antitoxine fut mise au point par Ramon. Ramon, en 1922 (238) décrit cette réaction telle qu'on peut l'observer dans des mélanges de toxine et d'antitoxine. Si l'on ajoute à un volume fixe de toxine des quantités variables d'antisérum et qu'on laisse ces mélanges à 45° pendant un certain temps, on observe dans certains tubes une opalescence d'intensité différente. L'opalescence augmente et au bout d'un certain temps, les tubes les plus opalescents flocculent : il se forme un précipité floconneux qui se dépose au fond du tube en laissant un surnageant clair. Cette réaction est tout à fait spécifique, il n'y a pas de floculation

si l'on ajoute à la toxine diphtérique du sérum antitétanique ou du sérum normal. Ramon remarque qu'il ne reste plus de toxine ni d'antitoxine libre dans le mélange qui floccule le premier; ce mélange est donc neutre. Ce n'est pas le cas pour les mélanges voisins qui, eux aussi, flocculent après un temps plus long. Les mélanges qui contiennent moins de sérum sont plus toxiques et vice-versa. On peut observer la même réaction si l'on ajoute à cette toxine, à titre égal, un sérum d'origine différente, ce qui permet d'évaluer « *in vitro* » le titre des sérums (239, 240). Cette méthode, qui est beaucoup plus simple et plus rapide que les titrages « *in vivo* », s'applique aussi au titrage des anatoxines et permet de connaître leur « valeur antigénique » (243).

La réaction de floculation mise au point pour la diphtérie a été aussi appliquée par Ramon au titrage de la toxine, de l'anatoxine et de l'antitoxine tétaniques (251) ainsi qu'au système staphylococcique (248, 249, 250) et à la mesure de l'activité de certains antigènes, des germes anaérobies de la gangrène gazeuse (252). Cette méthode peut être aussi appliquée au dosage des endotoxines et de leurs anticorps (253).

Comme nous venons de le voir, le titrage par la technique de Ramon consiste à ajouter à un volume constant d'antigène des quantités croissantes de sérum. Dans la technique de Dean et Webb (56), on ajoute au contraire des quantités variables d'antigène, ceci sous un volume constant. La floculation s'observe également en premier lieu pour des concentrations optima d'antigène et d'anticorps. Cette technique permet donc à nouveau de titrer des antigènes ainsi que leurs antisérums spécifiques.

La méthode de Dean et Webb ou « méthode des proportions optima à anticorps constant » s'applique surtout aux titrages des sérums de lapin. Le rapport des proportions optima anticorps/antigène reste constant, indépendamment des concentrations utilisées (27, 28).

Le titrage des systèmes antigène-antisérum de cheval se fait presque toujours suivant la technique de Ramon où l'on détermine « les proportions optima à l'antigène constant ». D'après Marrack (167), on désigne souvent dans la littérature sous le nom de « procédé α » la technique de Dean et Webb et celle de Ramon « procédé β ».

Dans le surnageant du système qui floccule le premier, il n'y a ni antigène ni anticorps libre, comme l'ont démontré Dean et Webb (56) et d'autres auteurs (27, 62, 115, 281, 287, 288, 289). Certains auteurs signalent un excès d'anticorps dans le mélange qui floccule le premier (38, 62, 289) ou un excès d'antigène (162). Glenny (83) trouve dans les mélanges de toxine et d'antitoxine qui flocculent les premiers, tantôt un excès d'antigène, tantôt un excès d'anticorps, ainsi que des mélanges neutres.

Le procédé α et le procédé β sont donc employés tous deux pour le titrage des systèmes antigène-anticorps. A priori, les rapports obtenus devraient être les mêmes, mais il a été démontré par plusieurs auteurs (53, 62, 171, 287, 288, 289, 314) qu'il y a en général une différence entre les deux optima. Taylor (288) a comparé les deux procédés avec le système ovalbumine cristallisé et l'antisérum de plusieurs lapins; il se révèle qu'avec le système à l'antigène constant, la concentration en anticorps est environ 1,65 fois celle de l'optimum à l'anticorps constant. Notons tout de suite que les différences obtenues avec les antisérums de lapin sont beaucoup plus marquées qu'avec les antisérums de cheval. Ainsi les proportions

optima obtenues dans le système toxine diphtérique - antitoxine de cheval sont par exemple peu éloignées (29, 30, 172, 291). La discordance entre les deux optima fut étudiée en détail par Boyd et ses collaborateurs (29, 30, 31); ils ont dressé des tableaux représentant les relations entre le rapport antigène-anticorps, les temps de floculation, ainsi que les optima de type α et de type β . Il en résulte, comme nous venons de le signaler, qu'avec le système lapin type R (rabbit), le minimum β est difficile à observer et qu'avec le sérum de cheval type H (horse), les deux optima sont nets et quelquefois très rapprochés.

L'étude sur la différence des deux optima a été reprise en détail, dernièrement, par Bowen et Wyman (24, 25). Ces auteurs signalent que dans la détermination de l'optimum de floculation, où le rapport antitoxine/toxine devrait en principe être la seule variante, il s'en ajoute une autre dans les techniques courantes, la « concentration totale de l'antigène et de l'anticorps ». Il semble exister un rapport linéaire entre le logarithme du temps de floculation et la concentration totale de l'antigène et de l'anticorps, de même qu'il existe une relation parabolique entre le rapport antitoxine/toxine et le logarithme du temps de floculation.

Si l'on compare à volume constant les deux systèmes de floculation dans deux séries de tubes où, théoriquement, les concentrations optima sont 1/1, il est possible que dans le système de Ramon la première floculation se fasse pour le rapport 1/1,1 et dans le système de Dean et Webb pour le rapport 1,1/•1,1 correspond dans le premier cas à une concentration plus forte de sérum et dans le deuxième cas, à une concentration plus forte en toxine, ce qui provoque dans les deux cas une augmentation des concentrations totales et amène un recul ou une avance de la première floculation. La différence entre les optima représentés par les deux techniques peut disparaître si l'on travaille dans les conditions où le rapport antitoxine/toxine est la seule variante et où, par conséquent, la concentration de la toxine et de l'antitoxine reste constante. Les auteurs conseillent pour les floculations coutumières de prendre la toxine 3,5 fois plus concentrée que le sérum. La quantité d'azote précipitable est alors, dans les deux cas, à peu près la même et la concentration totale de la toxine et de l'antitoxine reste donc constante si l'on n'ajuste pas le volume final.

3. LES « RÉACTIONS A L'ANNEAU » FORMÉES A L'INTERFACE DE DEUX COUCHES LIQUIDES (RING TEST)

La réaction à l'anneau est l'une des applications les plus sensibles de la précipitation spécifique; des réactions positives peuvent être obtenues avec l'antigène dilué au millionième et au-delà; elle sert en général, à la détection d'un antigène ou d'un anticorps spécifique, mais donne peu d'informations sur les concentrations. La réaction fut décrite pour la première fois par Uhlenhuth en 1901 (294) et ensuite par Ascoli en 1902 (7). Elle consiste à couler dans des tubes capillaires, sur une quantité fixe d'anticorps, des dilutions différentes de la solution contenant l'antigène correspondant, sans qu'il y ait mélange. A l'interface des deux couches, on observe après quelque temps, l'apparition d'un disque blanc; on prend comme titre la plus grande dilution d'antigène donnant encore une réaction positive. Cette technique est, entre autres, employée pour rechercher l'antigène et l'anticorps libres dans les surnageants des courbes de précipitation quantitative.

Il n'y a pas d'inhibition de la réaction par excès d'antigène parce que, par suite de la diffusion, il existe toujours une zone de concentration optimum de précipitation.

4. L'AGGLUTINATION D'ANTIGÈNES ADSORBÉS SUR PARTICULES NON SPÉCIFIQUES

Comme nous l'avons déjà dit, la différence entre la précipitation et l'agglutination tient au fait que dans le premier cas, les antigènes sont en relation moléculaire, tandis que dans le second, les antigènes sont associés à des cellules visibles au microscope ou pouvant être sédimentées par centrifugation. La réaction de précipitation peut être transformée en une agglutination si l'on adsorbe les antigènes sur des particules inertes telles que des cellules non spécifiques, par exemple des bactéries (182) ou des érythrocytes (133) ou encore des solutions colloïdales de collodion (42, 157, 302), de bentonite (34), etc... La réaction se fait avec une quantité fixe de ces particules sensibilisées auxquelles on ajoute de l'antisérum spécifique à différentes concentrations, ce qui donne naissance à l'agglutination spécifique. La réaction est très sensible. Goodner (94) a pu dépister des anticorps dans des dilutions allant jusqu'à 10^{-10} . Elle peut être utilisée pour l'étude des sérums de sujets hypersensibles à la tuberculine, à l'insuline (42) ainsi que dans tous les autres cas où la quantité d'anticorps présents est très faible.

L'adsorption de protéines sur des érythrocytes tannés pour la détection de faibles quantités d'antisérum a été mise au point par Boyden (32). Cette technique de « l'hémagglutination » a été utilisée par plusieurs chercheurs dans le système toxine- antitoxine diphtérique (72, 283). Des érythrocytes de mouton sont traités par une solution très diluée d'acide tannique et mis en contact avec la toxine ou l'anatoxine diphtériques. Après lavage, les cellules sensibilisées sont réparties dans des tubes, dans lesquels on ajoute de l'antisérum à différentes dilutions. Le titre de sérum correspond à la plus grande dilution donnant encore une agglutination positive.

Les rapports entre les titres des antisérums obtenus par la technique d'hémagglutination et les titres en unités internationales par détermination « *in vivo* » a été faite par Landy *et al.* (134) qui trouvèrent un rapport linéaire des logarithmes. L'application de cette technique à l'étude de l'avidité des sérums a été faite par Scheibel (273). Elle trouva que la réaction d'hémagglutination est moins influencée par l'avidité des sérums que la réaction intradermique et proposa même de remplacer cette dernière par l'hémagglutination.

5. ANALYSE DU PRÉCIPITÉ

L'étude quantitative du précipité nous renseigne sur la nature de la réaction antigène-anticorps et par conséquent, se trouve être de la plus haute importance pour un développement théorique de cette réaction.

Pour des mélanges de composition connue, on détermine non seulement la quantité de précipité formé, mais aussi les proportions en antigène et en anticorps de ces précipités. Nous traiterons plus loin en détail l'analyse des courbes de précipitation quantitative. Wu *et al.* (307, 308) furent les premiers à analyser les

précipités spécifiques. Plusieurs chercheurs ont essayé de déterminer la quantité de précipité formé en mesurant, par exemple, son volume après centrifugation en tubes gradués; d'autres ont fait des mesures photométriques de la turbidité (33, 223, 232), ont déterminé le poids du précipité (77), la densité du surnageant (193) ou fait des mesures de réflexion de la lumière (77, 91).

Les applications de mesures de densité optique sur les précipités remis en solution sont diverses. On peut directement faire des mesures dans l'ultra-violet sur des précipités redissous (65, 76, 309) ou faire des dérivés colorés par la réaction de Biuret (60, 301), la réaction à la ninhydrine (175) ou encore la réaction de Folin-Ciocalteu (110, 111, 235). Une étude comparative de la sensibilité et de la précision de ces méthodes fut faite par Mac Duffie et Kabat (158) ainsi que par Kunkel et Ward (131).

La technique la plus précise pour calculer la quantité de précipité formé reste sans doute la détermination de l'azote précipité par la microtechnique de Kjeldahl selon Markham (122, 163). L'inconvénient de cette technique est d'être très longue, mais il reste toujours préférable de l'utiliser pour l'étude des systèmes inconnus et de s'en servir comme référence, par exemple pour l'application des mesures optiques à ces systèmes. Si l'antigène ne contient pas d'azote, comme c'est le cas pour certains polysaccharides, tels les systèmes polysaccharides SIII-sérum de cheval antipneumocoque type III, étudiés par Heidelberger et Kendall (104), tout l'azote déterminé provient de l'anticorps et l'analyse du précipité donne tout de suite la quantité d'anticorps précipité.

Il est presque toujours plus compliqué de déterminer la composition des précipités, sauf dans quelques cas exceptionnels où les antigènes sont colorés (103) ou contiennent des métaux tels que cuivre (162), fer (35), iode (307, 308) qu'on peut facilement doser dans les précipités.

L'utilisation d'antigènes marqués nous a cependant fourni le moyen de calculer la composition du précipité sans beaucoup de difficultés. Le marquage des protéines par l'iode radioactif peut se faire par la technique de Masouredis (169) et celle de Eison et Keston (66). Burtin (39) a utilisé pour l'étude du système sérum-albumine humaine-immunsérum de cheval, la sérum-albumine marquée à l'¹³¹I. Pappenheimer et Yoneda (214) utilisèrent la toxine diphtérique marquée au ³⁵S qu'ils obtinrent par culture en milieu synthétique contenant de la méthionine radioactive.

6. COMPOSITION DU PRÉCIPITÉ

L'étude du précipité en vue de la réaction antigène-anticorps sera seulement valable si ce sont ces composants à eux seuls qui déterminent sa formation.

L'entraînement de protéines non spécifiques dans le précipité doit donc être nul. Marrack et Smith (165, 166) ont démontré que tel était bien le cas. Mais cela ne veut pas dire que le précipité contient toujours uniquement l'antigène et l'anticorps; il renferme souvent une portion non négligeable de complément, comme l'ont noté Heidelberger et Mayer (109). La présence du complément peut être facilement mise en évidence par une série d'expériences avec et sans adsorption du complément. Si l'on opère sur des sérums âgés, ce facteur ne rentre naturellement pas en ligne.

Il est aussi possible que les précipités antigène-anticorps contiennent des lipides,

comme on l'a souvent établi. Le système toxine-antitoxine diphtériques en comporte cependant très peu, comme il a été démontré par Marrack et Smith (165).

7. ÉTUDE QUANTITATIVE DU PRÉCIPITÉ

On sait depuis Heidelberger (106, 107, 108) et Pappenheimer (51, 116, 205, 208, 209, 214) que chez la plupart des espèces animales, la courbe de précipitation quantitative présente une forme en cloche (type précipitrine- type lapin), chez le cheval, elle présente une allure particulière (type floculation - type cheval).

Pour l'étude quantitative du précipité formé, on ajoute à des solutions de concentration variable d'antigène, une quantité fixe d'antisérum spécifique, le tout sous un volume final constant. Les tubes contenant ces mélanges d'antigène et d'anticorps restent un temps déterminé à l'étuve ou dans la glacière, temps nécessaire à une précipitation complète. Après centrifugation et plusieurs lavages, on détermine la quantité de protéines précipitées par l'une des techniques déjà décrites.

En général, on représente dans la courbe de précipitation quantitative l'azote total précipité en fonction des quantités d'antigène (exprimées en unités ou milligrammes de protéine). Le sommet de cette courbe correspond à la quantité maximum d'anticorps capable de réagir avec l'antigène spécifique; et permet entre autres de calculer la quantité d'anticorps précipitant du sérum : il suffit de défalquer la quantité d'antigène du précipité total. La quantité d'antigène ajoutée à l'antisérum doit être telle que l'on ait, en passant par la zone d'équivalence (et par neutralisation pour le système toxine-antitoxine) des tubes avec un grand excès d'anticorps et des tubes avec un grand excès d'antigène. La plus grande quantité de précipité se forme en général dans la zone d'équivalence où se trouve aussi l'optimum de floculation.

Dans la région d'excès d'antigène ou « zone inhibition », il y a solubilisation du précipité; la quantité d'anticorps présents ne suffit pas à précipiter la totalité des antigènes et il y a formation de complexes solubles ainsi que d'antigène libre.

Dans la zone d'excès d'anticorps, il y a deux possibilités : si l'on utilise des antisérums de lapin, il y a toujours formation d'un précipité, même si, à la limite, cette quantité devient très faible. Dans la représentation graphique, la courbe passe par l'origine; avec les antisérums de type cheval, la courbe ne passe pas par l'origine. Pour une certaine concentration d'antigène, il y a, comme dans la zone inhibition, solubilisation du précipité et formation de complexes solubles.

La courbe de type « lapin » est obtenue avec des sérums antiprotéiques de lapin, d'homme, de poisson et des sérums de chevaux antipolysaccharidés. Le sérum de chevaux antiprotéiques, tel que l'antitoxine diphtérique, donne la courbe de type « cheval ».

Si nous comparons ces deux courbes représentées par la figure 22, nous voyons que : celle du lapin a une forme « en cloche »; dans la région AB, on trouve dans le surnageant de l'anticorps libre, dans la zone d'équivalence très étroite BC, on ne peut détecter ni antigène ni anticorps libre, tandis que dans la zone d'inhibition CD, il y a de l'antigène libre. Dans la courbe de type cheval, la zone d'équivalence est représentée par une droite BC; tout au long de cette droite, on ne détecte ni antigène ni anticorps libre dans le surnageant. Nous remarquons que la courbe de type cheval diffère beaucoup de celle de type lapin.

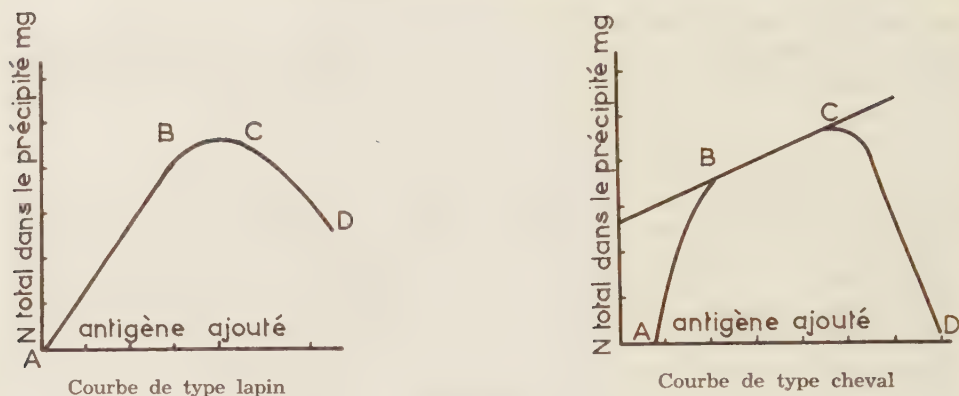


FIGURE 22

A quoi est due cette différence ?

Marrack (167) considère comme anormale la floculation toxine-antitoxine diphtériques où il n'y a plus de précipité si le rapport anticorps antigène est deux fois celui de l'équivalence, ceci par comparaison à la précipitation du système protéine-antiprotéine avec des sérums de lapin.

Les différences entre les deux systèmes ont été attribuées au fait qu'avec le système lapin, les courbes sont faites avec la fraction euglobulinique du sérum qui contient les anticorps, tandis que chez le cheval les antitoxines se trouvent en général dans la fraction pseudoglobulinique. La différence de solubilité entre euglobulines et pseudoglobulines est bien connue et peut donc expliquer la différence de forme des deux courbes. Rappelons à ce propos que les anticorps anti-polysaccharides de cheval donnent une courbe de type lapin et que ceux-ci se trouvent dans la fraction euglobulinique du sérum.

Cohn et Pappenheimer (51) ont étudié la courbe de précipitation quantitative avec des sérums de différentes espèces, y compris celui de l'homme. Ils ont trouvé que les antitoxines de l'homme, du singe, du cobaye et du lapin donnent toutes des courbes de type lapin, avec une zone d'équivalence très étroite et une précipitation dans la zone d'excès d'anticorps. La courbe de type cheval est spécifique de cet animal. En purifiant les sérums de l'homme, les auteurs établirent que dans le sérum humain, l'antitoxine est associée aux γ -2-globulines, comme c'est le cas dans le sérum de lapin et contrairement à ce qui se passe dans le sérum de cheval, où les anticorps font partie du constituant T (266) ou γ -1-globulines (58). Ces auteurs ont également recherché l'effet du pH sur la forme de la courbe. Les anticorps de l'homme et du lapin ont leur point isoélectrique à pH = 7,4 environ, tandis que celui des anticorps de cheval est à pH = 5,2. Il est donc possible, étant donné que les courbes sont faites aux environs de pH = 7,2, d'expliquer par là l'insolubilité des γ -2-globulines. Mais des courbes faites à pH = 5,2 détruisent cette hypothèse, car leur forme est inchangée : la différence n'est donc pas due au point isoélectrique des fractions, et comme le remarquent ces chercheurs, les anticorps de poulet sont associés aux γ -1-globulines et donnent une réaction de type lapin (59).

Une étude quantitative de la réaction toxine-antitoxine diphtériques fut publiée

en 1937 par Pappenheimer et Robinson (205). Nous donnons en détail les résultats obtenus par ces auteurs. On ajoute à 300 unités d'antitoxine des quantités croissantes de toxine, le volume final étant de 5 ml. Les tubes restent 3 heures à 42° et une nuit à la glacière. Après centrifugation et trois lavages, la quantité d'azote contenue dans le précipité est déterminée. Les surnageants sont testés pour déceler un excès de toxine ou d'antitoxine, ceci par la technique de floculation et par des réactions intradermiques sur lapin. Les auteurs utilisent trois types d'antitoxines : des sérums non purifiés, des sérums purifiés obtenus par fractionnement avec du sulfate d'ammonium et des sérums purifiés par digestion pepsique; tous ces sérums ont un rapport *in vivo* / *in vitro* d'environ 1; leurs toxines sont des préparations partiellement purifiées.

Ce travail a donné les résultats suivants : Les limites des zones d'équivalence sont les mêmes pour toutes les antitoxines et se situent environ entre 150 et 425 UF de toxine pour les 300 unités d'antitoxine utilisées. Tout au long de cette droite, il n'y a ni antigène ni anticorps décelable dans le surnageant. Les auteurs considèrent que dans toute cette zone d'équivalence, la totalité de la toxine et de l'antitoxine se trouvent dans le précipité (après précipitation, il n'y a pas de complexes solubles dans le surnageant), ce qui permet de supposer la formation de divers complexes toxine-antitoxine. La toxine et l'antitoxine forment d'abord un complexe soluble TA, capable de réagir avec encore plus de toxine, formant T_2A ainsi que T_3A . Le précipité formé à l'extrémité de la droite, du côté de l'excès d'anticorps, correspond à TA, l'optimum de floculation à T_2A et le précipité à l'autre extrémité de la droite avec un excès de toxine à T_3A .

Puisque tout au long de la zone rectiligne, il n'y a ni toxine ni antitoxine dans le surnageant, l'augmentation de l'azote du précipité le long de cette droite correspond uniquement à l'azote de la toxine ajoutée (déjà au début de la droite toute l'antitoxine est précipitée et reste constante). Il en résulte qu'on peut calculer la quantité d'azote par unité de floculation de la toxine en défalquant l'azote total du précipité pour 200 UF de l'azote total précipité pour 400 UF. La moyenne obtenue pour plusieurs déterminations donne 0,00046 mg N par Lf = 2 170 UF/mg N.

On peut également calculer la quantité d'azote antitoxique dans le précipité. Cette quantité, représentant 300 unités, est obtenue en faisant la différence entre l'azote du précipité total et l'azote de la toxine ajoutée. L'intersection de la droite avec l'ordonnée indique la quantité d'azote antitoxique spécifiquement précipitable par la toxine. Les auteurs trouvent, à deux exceptions près, environ 0,0016 mg N par unité d'antitoxine. L'antitoxine digérée donne un chiffre inférieur.

Il est possible, connaissant la quantité d'azote spécifiquement précipitable, de calculer le rapport antitoxine N/toxine N dans la zone d'équivalence. A l'optimum de floculation, le rapport est 3,5. Une seule détermination de la quantité d'azote spécifiquement précipitable à l'optimum de floculation permet donc de calculer le titre de la toxine et de l'antitoxine. La valeur trouvée pour le rapport UF/mg N de la toxine correspondait à celle obtenue pour des préparations de haute pureté, ce qui laissait supposer que ces préparations étaient pures ou ne contenaient que des traces d'impuretés. Les résultats de ce travail ont été vivement critiqués par Pope *et al.* (226). Un grand nombre d'expériences faites avec des toxines de pureté inégale et provenant de divers milieux, ainsi qu'avec des sérums d'origines variées (fractions obtenues par le sulfate d'ammonium ou par digestion pepsique, antitoxines provenant d'autres laboratoires) ne leur ont pas

permis de reproduire la courbe de Pappenheimer et de mettre en évidence la zone rectiligne. Les valeurs du précipité spécifique obtenu sont différentes de celles de Pappenheimer et collaborateurs, même en employant la toxine de ces auteurs.

Pope *et al.* (226) montrent que la toxine de Pappenheimer, testée par la technique de diffusion en gel, donne encore 14 lignes, ce qui signifie qu'elle est loin d'être pure et ils en donnent la preuve en mettant au point une nouvelle technique de purification qui leur permet d'obtenir la toxine sous forme de cristaux titrant 3 200 UF/mg N. Les différences obtenues seraient dues au fait que les antitoxines testées contiennent des anticorps autres que la toxine et ceux-ci donnent également naissance à des précipités.

Si l'on traite ces antitoxines digérées par des protéines P (filtrats de culture à une concentration de fer telle que la formation de toxine soit complètement supprimée), il y a formation d'un précipité. La digestion de ce précipité donne des anticorps autres que l'antitoxine, et testé contre la toxine brute, de multiples lignes. Le surnageant de ces précipités, testé contre la toxine brute, contient la totalité de l'antitoxine et ne donne que deux lignes.

Les précipités spécifiques sont donc dus à des mélanges de plusieurs systèmes antigène-anticorps et une partie de l'azote précipitable provient de systèmes autres que le système toxine-antitoxine.

Les auteurs supposent même que le système toxine-antitoxine ne flocculerait pas en l'absence de systèmes « contaminants » et qu'il devrait donc être possible de purifier la toxine jusqu'à ce qu'elle ne floccule plus avec l'antitoxine. En chauffant la toxine pendant 16 minutes à 100°, celle-ci perd peu de son pouvoir flocculant, mais ne se combine plus avec l'antitoxine (232). Pope (232) montre également que la différence entre les courbes de type cheval et de type lapin est due à la formation de complexes solubles entre les globulines antitoxiques de cheval et la toxine. Les courbes de précipitation spécifique des toxines de haute pureté et l'antitoxine digérée faites en présence de 20 % de sulfate d'ammonium, au lieu d'avoir la forme de type cheval, passent par l'origine.

L'étude de la courbe de précipitation a été aussi faite par Bowen et ses collaborateurs (26). Travaillant dans les mêmes conditions que les auteurs déjà cités, ils ont étudié la précipitation spécifique entre des toxines purifiées et des sérums digérés ainsi que des sérums fractionnés par le sulfate d'ammonium. Ces auteurs trouvent en général les mêmes types de courbes que Pappenheimer et collaborateurs, avec la différence que la zone d'équivalence est arrondie au lieu d'être droite. Néanmoins, la position éventuelle d'une droite sur la courbe est calculée par la méthode des moindres carrés, ainsi que l'interception de cette droite avec l'ordonnée. Les valeurs trouvées pour la quantité de toxine spécifiquement précipitable varient d'un sérum à l'autre. Dans certains cas, le coefficient angulaire de la droite est plus faible que celui de la droite de Pappenheimer, ce qui indique une toxine de pureté plus élevée; le cas contraire indique la précipitation de systèmes accessoires. La quantité d'antitoxine spécifiquement précipitable varie d'un échantillon à l'autre et dépend de leur origine. Les chiffres les plus bas sont obtenus avec des antitoxines digérées.

Ces auteurs montrent également qu'il est possible de détecter un excès de toxine et d'antitoxine dans le surnageant; ces quantités sont néanmoins faibles. L'utilisation de protéines P montre (contrairement à ce qui fut affirmé par Pope)

qu'avec la plupart de leurs antitoxines, il n'y a pas de co-précipitation. Etudiant l'effet de la dilution, ces auteurs trouvèrent que la précipitation est incomplète si les courbes sont faites à des concentrations trop diluées. L'influence de la dilution se montre davantage aux extrémités de la zone d'équivalence et les courbes deviennent plus arrondies. Alors même que les résultats de Pappenheimer ne pouvaient être reproduits, Bowen et ses collaborateurs en approuvaient le système, mais seulement pour un système idéal toxine-antitoxine.

8. PLAN DE TRAVAIL

Les résultats obtenus par les divers auteurs dans l'étude quantitative du système toxine-antitoxine diphtériques ne sont pas les mêmes. Nous avons donc voulu réexaminer ce problème et nous avons étudié les divers facteurs qui peuvent influencer sur la forme de la courbe de précipitation quantitative. Nous avons fait l'étude quantitative de la réaction de précipitation du système toxine-antitoxine diphtériques avec les divers types d'antitoxines rencontrés au cours de l'hyper-immunisation.

L'influence des facteurs suivants a été étudiée :

- a) Il a été démontré qu'en fin d'hyperimmunisation, l'antitoxine se trouve associée aux globulines β -2, tandis qu'au début l'antitoxine peut avoir la mobilité des globulines γ . L'influence de ces deux types d'antitoxines sur la forme de la courbe de précipitation quantitative, sujet qui n'a pas encore été étudié, a été mise en évidence.
- b) L'étude a été faite avec des toxines brutes concentrées ainsi qu'avec des toxines purifiées, pour déceler l'influence de systèmes autres que celui de la « toxine-antitoxine » proprement dite.
- c) Les sérums bruts ont été purifiés par relargage aux sels neutres, afin d'étudier la réaction de précipitation avec des fractions pures, contenant uniquement des antitoxines de type β -2 ou γ -globulines. Des mélanges artificiels de ces deux fractions ont démontré l'influence des antitoxines de mobilité β -2 sur une courbe faite avec des antitoxines de mobilité γ et vice-versa.
- d) Les sérums ont été également purifiés par la digestion des précipités spécifiques.
- e) L'influence de la concentration totale des 2 réactifs, toxine et antitoxine, sur la forme des courbes a été étudiée.
- f) L'utilisation d'une toxine radioactive a démontré l'existence d'anticorps non précipitants dans certains sérums.
- g) Les antitoxines obtenues chez des chevaux sans immunité de base (à Schick positif) ont été étudiées.
- h) La présence d'anticorps dirigés contre les divers motifs antigéniques de la toxine a été mise en évidence et leur influence sur la réaction « toxine-antitoxine » associée à la neutralisation de la toxine est discutée.

9. TECHNIQUES EMPLOYÉES

Les courbes ont été faites dans des conditions standards, voisines de celles utilisées par Pappenheimer et Robinson (205). Des quantités croissantes de toxine ont été ajoutées à 400 unités d'antitoxine. Le volume final a été ajusté à 5 ml. Dans certains cas exceptionnels, nous avons été obligés de dépasser ce volume, le titre des antitoxines étant faible, mais un volume final de 10 ml n'a jamais été dépassé. Le tampon employé était du borate de sodium, concentration M/50 et pH = 7,2, contenant 9 % de NaCl. Toutes les déterminations ont été faites en double. Les tubes sont restés 2 heures à 37° C, puis deux jours à 0° C. Ils ont été ensuite centrifugés à 0° C pendant 10 minutes à 10 000 tours, dans une centrifugeuse refroidie Servall. Le précipité a été bien homogénéisé dans quelques gouttes de tampon à l'aide d'un agitateur en verre, et ensuite mélangé avec encore 5 ml de tampon à 0° C; les dernières quantités ajoutées ont servi à laver l'agitateur. Après centrifugation, l'opération a été répétée une seconde fois. Le précipité ainsi lavé a été dissous dans 1 ml de soude N/10. La solution a été transférée dans un matras de minéralisation à l'aide d'une pipette Pasteur. Le tube en verre et la pipette ont été lavés deux fois avec 2 ml de tampon. La quantité d'azote de chaque précipité a été déterminée dans l'appareil de type Markham. Sur les surnageants de précipitation, nous avons fait les dosages suivants :

1) Recherche de la toxine libre :

a) *in vivo*, par la réaction intradermique, technique de Jerne (121). La « dose minima réactive » (D.M.R.) est définie avec Jensen (120) comme la plus faible dose, qui, injectée sous un volume de 0,1 ml par voie intradermique au lapin blanc, provoque au bout de 44 heures une zone d'érythème de 8 mm de diamètre. Toutes les dilutions ont été effectuées à 0° en eau peptonée salée :

NaCl	9 g
Peptone	10 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml
pH = 7,4	

200 000 D.M.R. correspondent à environ une unité de floculation. Nous avons calculé la totalité de D.M.R. présentes dans chaque surnageant. Pour la représentation graphique, ce chiffre a été divisé par 200 000.

b) *in vitro*, par la technique de diffusion en gel et le test à l'anneau. Ces deux techniques ont été décrites en détail. Le tube de précipitation spécifique contenait 0,5 ml de sérum gélosé à 20 UF/ml, 0,5 ml de gélose et 0,5 ml de chaque surnageant. Les tests à l'anneau ont été faits avec le sérum à 10 et 50 UF/ml.

2) Recherche des anticorps :

a) *in vivo*, la quantité totale d'unités internationales d'antitoxine (unités L₊) présentes dans chaque surnageant a été déterminée par titrage sur cobaye.

b) *in vitro*, les mêmes techniques (diffusion en gel et ring test) utilisées pour la

recherche de la toxine libre ont été employées, le sérum étant remplacé par la toxine à la même concentration¹.

Dans l'étude *in vitro* des surnageants de mélanges complexes par la technique de diffusion en gélose, on a utilisé d'une part le sérum et la toxine employée pour la courbe, et d'autre part un sérum et une toxine ne donnant qu'une zone de précipitation spécifique; ceci permet de reconnaître la toxine et l'antitoxine parmi les divers constituants présents dans ces mélanges d'antigènes et d'anticorps.

Les caractères des différentes antitoxines que nous avons préparées, ainsi que ceux des antitoxines d'origines diverses, sont décrits dans le chapitre V. Nous avons utilisé des toxines de pureté variable. On trouvera le détail de ces préparations ainsi que leur méthode d'obtention dans le chapitre III.

10. INFLUENCE DE LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ANTICORPS AINSI QUE DE LEUR CONCENTRATION SUR LA COURBE DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE

Les premières études de précipitation quantitative ont été faites avec des saignées du cheval 1451. C'était un des premiers chevaux que nous avons hyperimmunisés avec de la toxine purifiée. Notre but était l'obtention d'un antiserum contenant comme seul anticorps, l'antitoxine. La réaction antigène-anticorps de ce sérum serait celle d'un système unique et la présence d'impuretés dans la toxine serait sans influence sur la précipitation.

Au cours de l'hyperimmunisation, nous avons effectué des saignées d'essai pour suivre, par la technique de diffusion en gélose, la formation d'anticorps. Au début de l'hyperimmunisation, le seul anticorps détectable chez ce cheval était effectivement l'antitoxine. Au contraire, la saignée finale, effectuée après la montée du titre, contenait plusieurs anticorps accessoires. Nous avons donc été obligés, pour avoir assez de sérum, afin d'étudier la phase de début de l'hyperimmunisation, de faire un mélange de toutes les saignées effectuées entre le 12^e et le 43^e jour. Les saignées d'essai étaient en général de 30 à 40 ml de sang, tandis que la saignée finale comportait deux fois six litres à deux jours d'intervalle.

Nous avons déjà vu que les saignées du début de l'hyperimmunisation avaient un rapport *in vivo* / *in vitro* élevé, égal à 1,60, tandis qu'en fin d'hyperimmunisation, cette valeur n'était plus que de 0,89. L'antitoxine se trouvait au début de l'hyperimmunisation principalement associée à la fraction des γ -globulines, tandis qu'en fin d'hyperimmunisation, sa mobilité était celle d'une β -2.

La saignée finale a donné la courbe classique de type cheval. Le précipité obtenu était soluble dans un excès de toxine ainsi que dans un excès d'antitoxine (Fig. 23, courbes 1 et 2, tableau 17). Nous avons fait la courbe avec une toxine de pureté élevée : 3 000 UF/mg N, ainsi qu'avec une toxine brute concentrée.

On voit que, bien que les impuretés n'affectent pas beaucoup la forme de la courbe, elles ont tout de même une influence sur la pente. Il est probable qu'avec

1. La présence de toxine ou d'antitoxine libre déterminée par les tests *in vitro* sera indiquée dans la représentation graphique des courbes par un trait; une ligne en pointillé indiquera les résultats faiblement positifs.

la toxine brute, il y a formation de précipités par les systèmes accessoires qui se surajoutent au précipité toxine-antitoxine.

L'étude du mélange des saignées de début montre des résultats tout à fait inattendus. La courbe se rapproche du type lapin; bien qu'il y ait encore une pré-zone, celle-ci est très réduite. La courbe (Fig. 23, courbe n° 3), comparée à celle des globulines β -2 en fin d'hyperimmunisation, est beaucoup plus longue et plus haute. La quantité totale d'azote précipité est d'environ deux fois plus élevée, le maximum d'azote précipitable se trouve à 1 200 unités de toxine et est égal à 1,6 mg N, tandis que pour les β -2, ce maximum se trouve aux environs de 400 unités de toxine avec seulement 0,8 mg N dans le précipité.

Dans le cas des β -2, le précipité est entièrement soluble en 700 unités de toxine, tandis que, pour les γ -globulines, on doit atteindre 1 960 unités de toxine pour solubiliser les précipités.

A première vue, on pourrait penser que ces précipités sont dûs à des systèmes « accessoires ». Mais nous savons que ce sérum contenait seulement l'antitoxine et pas d'autres anticorps. D'autre part, l'étude des surnageants nous montre que dans le cas des globulines β -2, les surnageants contiennent déjà des traces de toxine libre à l'équivalence de floculation, tandis que c'est seulement après avoir dépassé 1 100 unités de toxine ajoutée qu'on en trouve dans la courbe des γ -globulines.

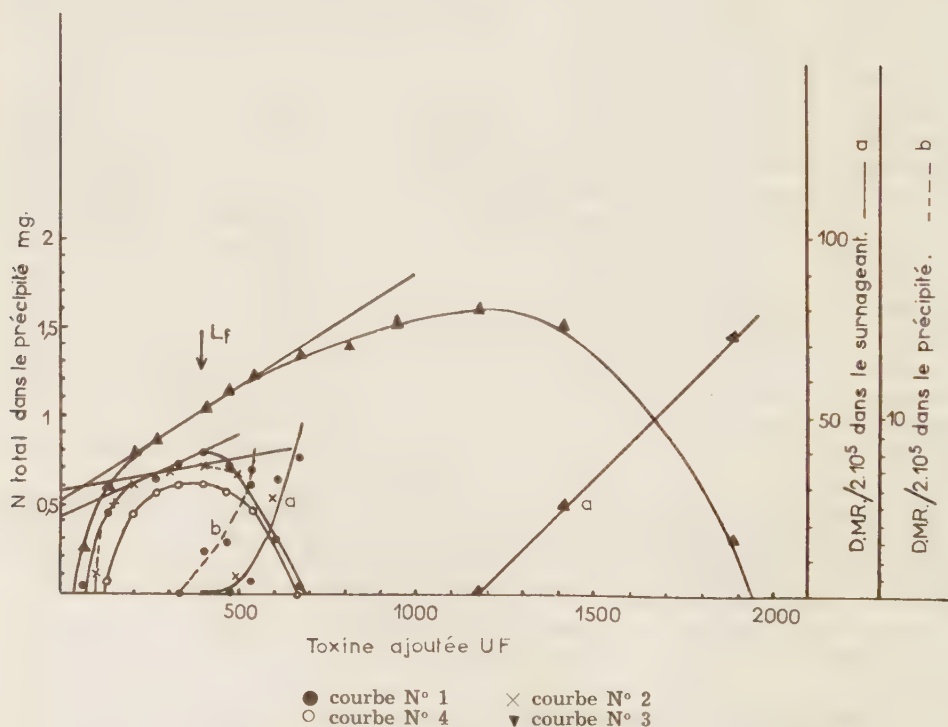
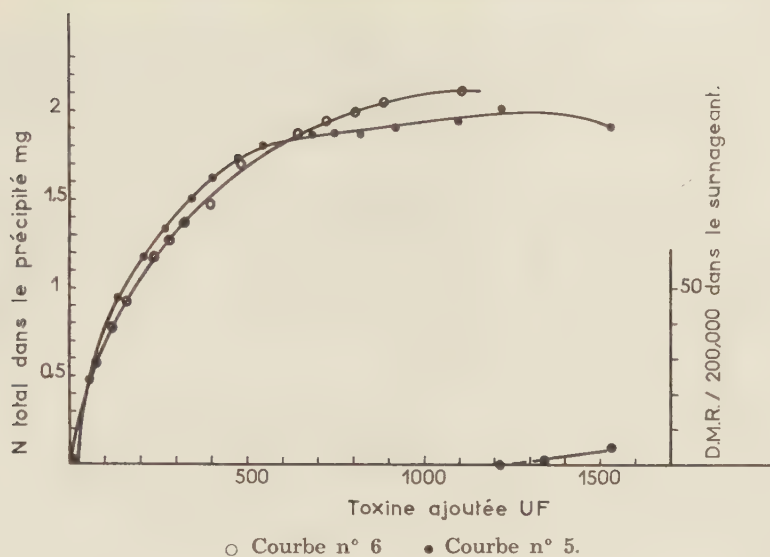
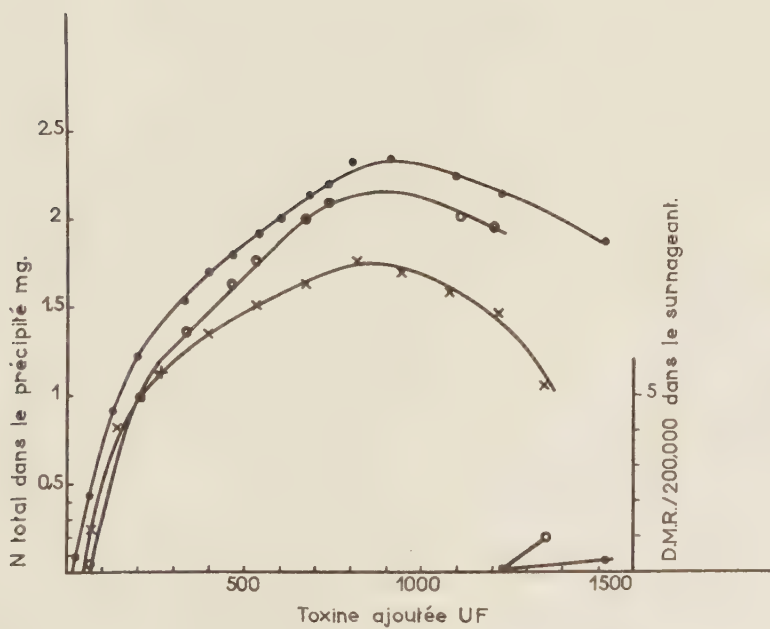


FIGURE 23

FIGURE 24. Sérum 441; Saignée du 17^e jour.FIGURE 25. Sérum 441; Saignée du 43^e jour.

Le rapport élevé *in vivo* / *in vitro* se reflète donc dans les surnageants des précipités. La toxine libre apparaît à partir du point où l'azote total précipité diminue. La petite quantité de sérum dont nous disposions ne nous a pas permis d'étudier la courbe des saignées du début de l'hyperimmunisation avec la toxine pure.

Nous avons donc choisi un autre sérum contenant des quantités élevées de globulines γ , le sérum n° 441. Les figures 24 et 25 et le tableau 17 montrent les résultats obtenus avec deux saignées différentes. Le cheval 441 a présenté pendant toute l'hyperimmunisation, des sérums avec une quantité élevée de gamma-globulines. Le rapport *in vivo* / *in vitro* qui était de 2,9 au début de l'hyperimmunisation est de 1,89 à la fin, mais le titre flocculant de sérum reste bas : au début 140, et à la fin, 225 unités par ml de sérum.

Pour les sérums à une zone, les différences des courbes établies avec toxine brute d'une part, toxine pure d'autre part, sont minimes. Les petites divergences doivent correspondre à des traces d'anticorps accessoires. Nous verrons plus loin que pour des sérums « complexes » les différences sont considérables.

Pour interpréter nos résultats d'une manière plus précise, nous avons donc pensé à purifier ces sérums et à faire les courbes avec des fractions γ ou β -2 électrophorétiquement pures. Avant de donner les résultats de cette étude, nous voulons d'abord signaler un autre problème, celui des concentrations finales des mélanges étudiés.

Toutes les courbes ont été faites à 400 unités antitoxiques dans un volume final de 5 ml, correspondant donc à 80 unités antitoxiques par ml.

Bowen *et al.* (26) ont déjà démontré que la précipitation reste incomplète si elle est faite à des concentrations trop faibles.

Nous avons fait avec les deux types d'antitoxines l'étude de la courbe de précipitation quantitative avec des concentrations dix fois plus faibles.

Le sérum 1451 à globulines β -2 ne donne, dans des conditions normales, deux heures à 37°, 48 heures à 0°, pour toutes les concentrations de toxine, aucune flocculation, seulement une opalescence. Il se forme un précipité si on laisse les tubes encore 3 jours à 37°, mais on voit que la précipitation, comparée à celle obtenue sans dilution, reste incomplète (tableau 17, courbe n° 4, Fig. 23).

L'expérience faite avec un sérum de type γ -globuline donne le même résultat; dans les conditions normales, il y a un faible précipité dans les tubes qui se situent autour de l'équivalence de flocculation (entre 300 et 600 unités de toxine); les autres tubes sont opalescents. La courbe n° 9, figure 25, présente les résultats obtenus après 8 jours à 37°. Même après cette très longue incubation, la précipitation reste incomplète. Ces résultats montrent donc de nouveau l'importance de la concentration finale des mélanges réagissants.

Les courbes 10, 11, 12 et 13 (Fig. 26) montrent les résultats des expériences effectuées avec les saignées du cheval 341. Ces saignées ont, au début de l'hyperimmunisation, une valeur *in vivo* / *in vitro* de 1,37 et en fin d'hyperimmunisation, de 0,91.

Nous voyons une fois encore que la forme générale de la courbe ne change pas si elle est faite avec une toxine brute ou purifiée, mais les valeurs de la pente donnent des chiffres tout à fait différents. Au début de l'hyperimmunisation, il y a peu d'anticorps annexes; bien que les valeurs correspondantes ne soient pas celles d'une toxine pure, elles sont voisines, alors qu'à la fin, elles ne se recoupent plus

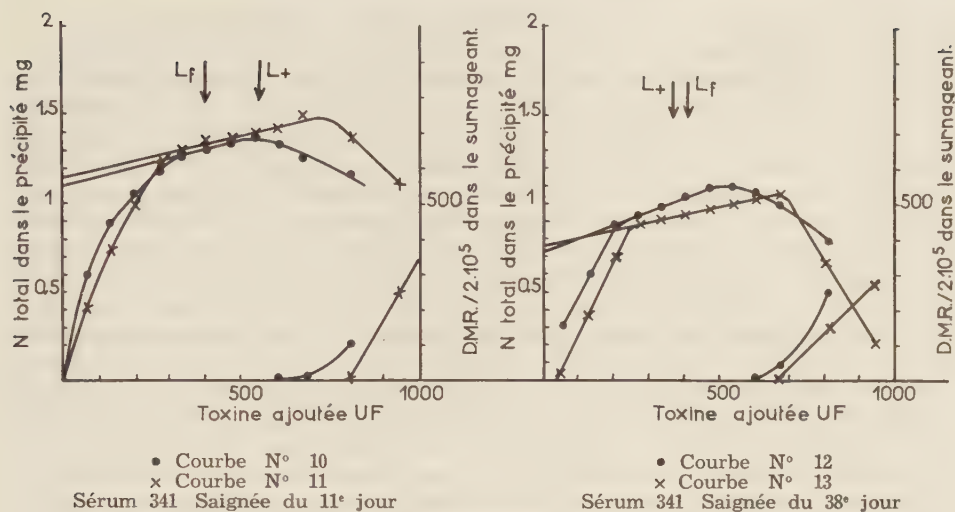
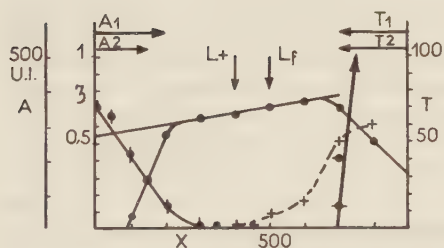
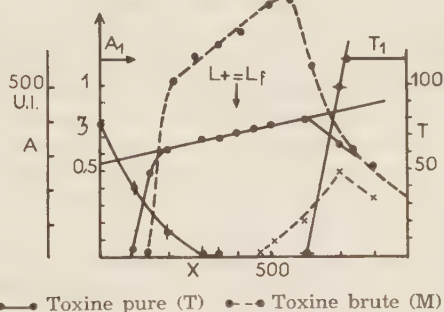


FIGURE 26

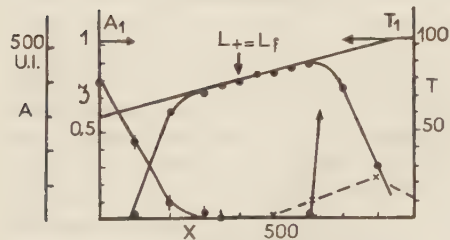
Courbe 14



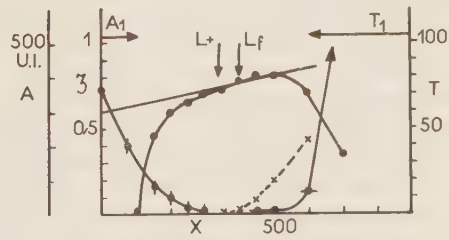
Courbe 15



Courbe 16



Courbe 17



3 N total dans le précipité mg
 A Antitoxine libre dans le surnageant
 T D.M.R./2.10⁵ dans le surnageant
 X Toxine ajoutée UF

A₁ Antitoxine libre *in vitro* (géluse)
 A₂ Antitoxine libre *in vitro* (ring test)
 T₁ Toxine libre *in vitro* (géluse)
 T₂ Toxine libre *in vitro* (ring test)

FIGURE 27

du tout; il y a donc de nouveau précipitation des systèmes accessoires avec le système sérum-toxine brute.

Comparons également quelques antitoxines d'origine étrangère aux nôtres. L'étalon antitoxique et l'étalon de floculation de Copenhague ont tous deux des valeurs *in vivo* / *in vitro* égale à 1 et sont de type β -2. Nous voyons que leurs courbes sont de type cheval. L'influence des systèmes accessoires sur l'azote précipitable et la forme de la courbe de précipitation quantitative peut être considérable pour certains sérums complexes. Nous portons également sur la figure 27, à titre de comparaison avec la courbe n° 15 (étalon de floculation de Copenhague - toxine pure), la courbe obtenue avec une toxine brute concentrée (courbe en pointillé). L'azote total précipitable est dans ce dernier cas beaucoup plus élevé, la pente de la zone rectiligne est tout autre que celle obtenue avec une toxine pure. Le seul moyen d'étudier les courbes « toxine-antitoxine », dans le cas où le sérum est complexe, est d'employer une toxine pure. L'un des sérums étudiés par Pappenheimer, le n° 1520-5353 AD et mis à notre disposition par cet auteur, donne également une courbe de type cheval. Nous constatons encore (courbes nos 14, 15, 16, Fig. 27) que les valeurs calculées à l'aide de la pente ne correspondent pas à celles des toxines pures utilisées. L'étude de ces antitoxines de type β -2 nous a permis d'y associer un autre phénomène, celui de la toxine libre.

Cohn et Pappenheimer (51) titrent la toxine et l'antitoxine libre dans les surnageants de précipitation et considèrent que si l'on ajoute à l'antitoxine des quantités croissantes de toxine, la neutralisation se fait de la façon suivante. Il y a d'abord un excès d'antitoxine jusqu'à un point situé à gauche de l'optimum de floculation dans la région d'excès d'antitoxine. A partir de ce point jusqu'au point L_r , le surnageant ne contient ni toxine ni antitoxine libre. Le point L_r et le point L_0 sont très voisins. $L_0 = 1,2-1,4 L_r$ et $L_+ = 1,5-1,6 L_r$. On doit donc ajouter une très grande quantité de toxine à la quantité L_r pour atteindre le point L_+ . Sur la courbe publiée par ces auteurs, le point L_+ se trouve juste à l'endroit où l'on observe une diminution dans la quantité d'azote précipitable. D'après ces chercheurs, la zone d'équivalence est très large et peut donc expliquer pourquoi la différence entre la dose L_0 et la dose L_+ de toxine correspond non pas à 1 DMM, mais en général à 20 ou 30 doses mortelles (Phénomène d'Ehrlich). Ce fait explique [voir aussi Cohn (52)] la relation linéaire entre la toxine ajoutée et la quantité d'azote précipitable.

Dans les systèmes autres que le système toxine-antitoxine cheval, c'est-à-dire pour des courbes faites avec des antisérums humains, de lapin, de cobaye, etc..., tous ces points coïncident.

Nous avons également titré tous nos surnageants *in vivo* et nous avons trouvé que, malgré les traces de toxine libre avant la baisse de la quantité d'azote précipitable (fait d'ailleurs également observé par Bowen (26)), la présence de grandes quantités de toxine libre ne se manifeste qu'un peu après le maximum.

Il nous a tout de même semblé peu probable d'avoir à ajouter, à partir du point L_r , un excès variant entre 70 et 200 unités de floculation de toxine, suivant les courbes étudiées, pour trouver de la toxine libre en quantité supérieure à des traces (cf. tableaux 17 et 18 et les courbes 1, 14 et 17) d'autant plus que ces antitoxines ont des valeurs *in vivo* / *in vitro* inférieures à 1.

Nous avons donc examiné les précipités et déterminé la toxicité de ces complexes. Le précipité, une fois lavé, a été homogénéisé dans une quantité de tampon égale

au volume de l'expérience (en général 5 ml). A partir de ces mélanges, nous avons fait des dilutions en agitant auparavant les tubes et les verres afin d'éviter le dépôt du précipité. Il a été établi que tous les précipités sont toxiques à partir du point L_+ et que la toxicité augmente avec la quantité de toxine ajoutée (cf. courbes n^{os} 1, 14, 17 et 24). La recherche des points L_0 , L_r , L_+ ne peut donc se faire uniquement par l'étude des surnageants.

Nous avons également déterminé par titrage *in vivo* la quantité d'antitoxine libre dans les surnageants. Nous avons trouvé que pour ces sérums les quantités baissent rapidement et ensuite plus lentement jusqu'au point L_+ . Ce dernier ne coïncide pas en général avec le début de la zone rectiligne; mais la quantité d'antitoxine libre retrouvée entre ces deux points est néanmoins faible.

Les tests par diffusion en gel ont montré qu'une quantité de toxine libre déterminée *in vivo* dans les surnageants et supérieure à 2,5 unités de floculation, est également décelable *in vitro*; les résultats obtenus par la technique de diffusion en gélose et par la réaction à l'anneau sont identiques. Cependant, on trouve encore de l'antitoxine libre par titrage *in vivo* dans les surnageants qui donnent une réaction négative par la diffusion en gel (cf. courbes n^{os} 14, 17, 18 et 24). Ceci indique donc la présence d'anticorps neutralisants non précipitants ou coprécipitants ou encore l'existence de complexes solubles contenant un excès d'anticorps. Ces complexes solubles ne diffusent pas et ne sont par conséquent pas détectables par la diffusion en gel.

Nous avons vu que la forme de la courbe des γ -globulines est tout à fait différente de celle des β -2 globulines. Les complexes antigène-anticorps se solubilisent beaucoup plus facilement dans le cas des β -2-globulines. Il serait possible que la pente de la courbe des antitoxines β -2 ne donne pas la valeur exacte des unités de floculation par mg d'azote de la toxine, parce qu'il y a toujours, même en faible quantité, un peu d'antitoxine γ dans ces sérums. Une interaction de ces deux types d'antitoxines peut avoir une influence sur la pente, raison pour laquelle nous avons tenu à fractionner les antisérums.

11. ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE AVEC DES SÉRUMS PURIFIÉS PAR PRÉCIPITATION SALINE

Nous nous sommes proposé de purifier nos sérums afin d'obtenir des fractions pures, soit en γ -, soit en β -2-globulines et d'étudier la réaction de précipitation quantitative avec, d'une part, des fractions contenant seulement ces deux types d'antitoxines et, d'autre part de faire des mélanges artificiels.

Les sérums ont été fractionnés par précipitation saline avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. La fraction 0-33 % de saturation en sulfate d'ammonium est très riche en γ -globulines, tandis que la plus grande quantité de globulines β -2 se trouvent dans la fraction 33-50 % de saturation. En répétant ce fractionnement, on peut obtenir des préparations qui contiennent presque uniquement des globulines γ ou des globulines β -2. Le contrôle de la mobilité des fractions a été fait par la technique d'immuno-électrophorèse (voir fig. 20).

Pour la préparation d'antitoxines γ , nous nous sommes servis de sérums riches en γ -antitoxine; pour la préparation d'antitoxines β -2, de sérums riches en β -2-antitoxine. L'opération inverse donne de moins bons résultats.

A un volume déterminé de sérum, nous avons d'abord ajouté la même quantité d'eau distillée et ensuite le même volume de sulfate d'ammonium saturé. Le précipité ainsi obtenu a été centrifugé et lavé avec une solution à 1/3 de saturation en sulfate d'ammonium et dialysé contre un tampon de phosphate de potassium M/15, pH = 7,2, contenant 0,172 M de chlorure de sodium. Au surnageant de précipitation, on ajoute encore un volume de solution de sulfate d'ammonium saturé et le précipité est également recueilli et lavé. Nous avons également préparé des fractions qui précipitent entre 0,40 et 0,50 pour cent de saturation en sulfate d'ammonium.

Nous avons étudié 4 préparations que nous désignerons ici par les numéros de leur courbe, fractions 17, 18, 19, 20. Les résultats obtenus avec la fraction β -2 du sérum 1451 sont représentés par la courbe 17. Le rapport *in vivo* / *in vitro* de cette fraction est égal à 0,85. Entre 350 et 500 unités de toxine ajoutées, le surnageant ne contient que des traces de toxine libre, tandis que le précipité est de nouveau toxique à partir du point 350. Le surnageant contient, d'autre part, de l'antitoxine libre décelable jusqu'au point correspondant à 300 unités de toxine ajoutées. Nous voyons donc que ces résultats reflètent tout à fait le rapport *in vivo* / *in vitro* du sérum. Mais, au contraire, la pente ne dépend pas de la valeur de la toxine pure.

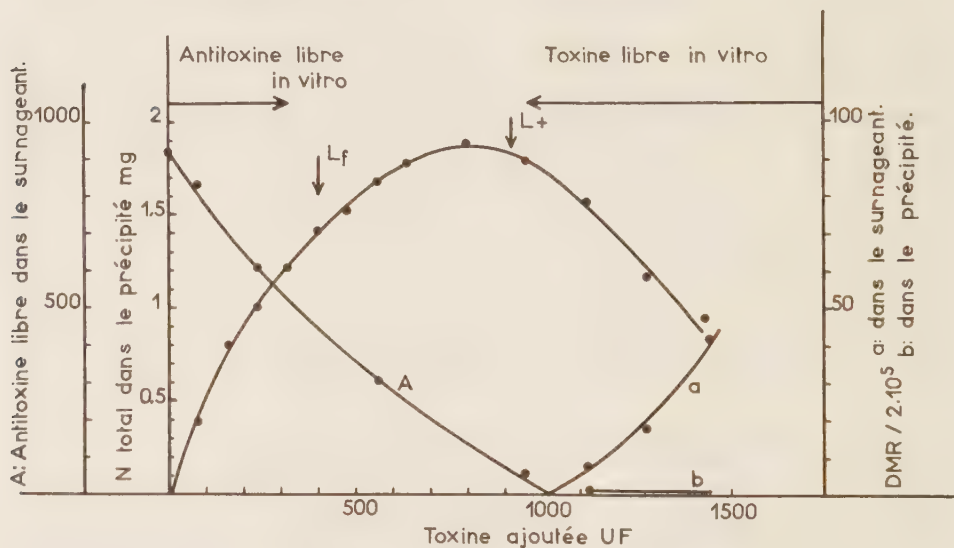


FIGURE 28. Courbe n° 18; Sérum 441 fraction γ .

La fraction globulines γ du sérum 441 (cf. courbe 18) donne de nouveau une courbe de type lapin. Contrairement à ce qui a été observé dans les antitoxines de type β -2, les précipités sont peu toxiques. L'existence d'un excès d'antitoxine, non détectable par la diffusion en gélose, se remarque à nouveau. L'antitoxine libre dans le surnageant est seulement décelable jusqu'au point 320, tandis que le test *in vivo* en indique la présence jusqu'au point L_+ . Une très légère différence entre

le point L_+ du sérum et l'antitoxine libre déterminée dans les surnageants est très probablement due aux conditions de l'expérience. La valeur L_+ d'un sérum est déterminée au niveau d'une unité/ml, tandis que la précipitation se fait pour 80 unités par ml. Il est également possible que les temps de mise en contact jouent un rôle dans les titres obtenus. Autre caractère de ces antitoxines : le point L_+ se trouve situé après le maximum de précipitation de la courbe.

La figure 29 et le tableau 18 (courbes n^{os} 21, 22 et 23) montrent les résultats obtenus avec des mélanges artificiels des deux types d'antitoxines. Nous voyons que le rapport *in vivo* / *in vitro* augmente progressivement avec la teneur en γ antitoxine : en même temps, la forme de la courbe change et présente des allures intermédiaires entre les deux extrêmes.

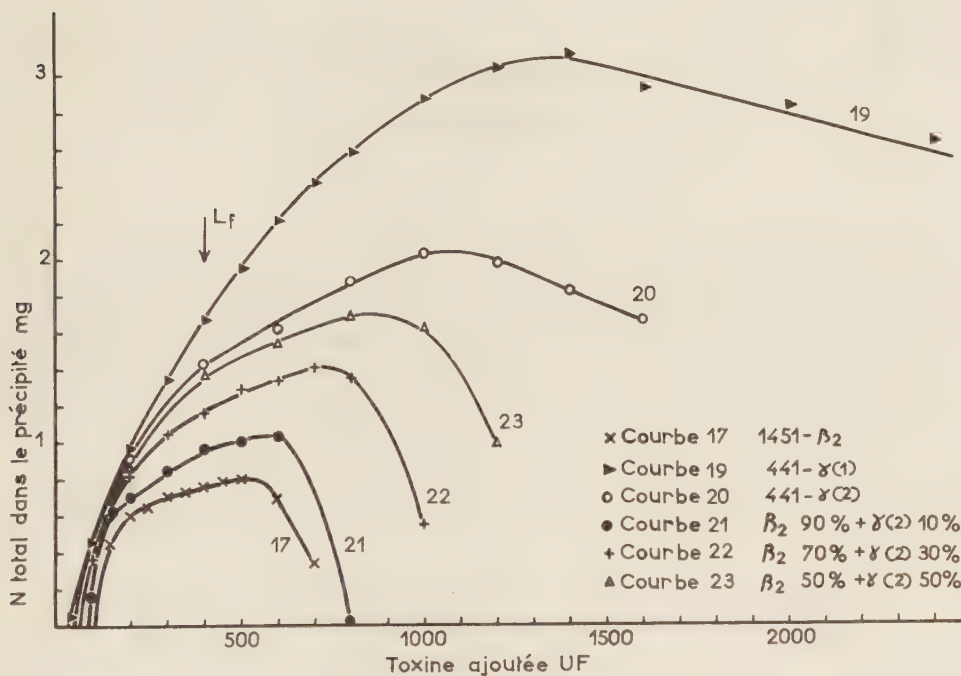


FIGURE 29

La figure 30 représente l'analyse complète de la réaction de précipitation quantitative entre une toxine de haute pureté et un sérum purifié contenant tous les anticorps anti-protéines diphtériques. Le sérum étudié n^o 906 est une préparation commerciale de l'Institut Pasteur; les saignées de plusieurs chevaux hyperimmunisés pendant une longue période avec de la toxine brute ont été mélangés et purifiés par digestion enzymatique suivant la technique décrite par Amoureux et Yeu (5).

Nous avons déjà montré par la technique de diffusion en gélose que ce sérum contient de nombreux anticorps dirigés contre les protéines de filtrat de culture du bacille diphtérique (anticorps accessoires).

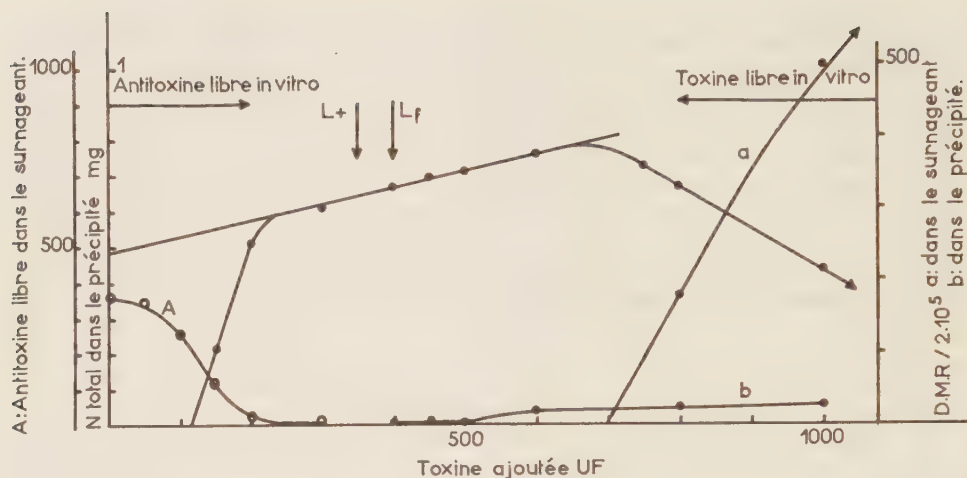


FIGURE 30. Courbe n° 24; Sérum 906.

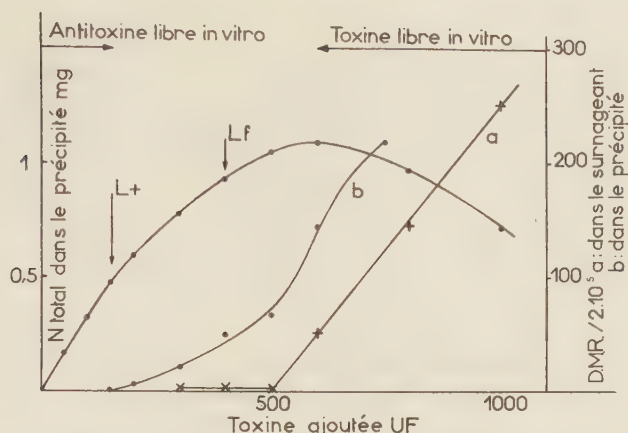
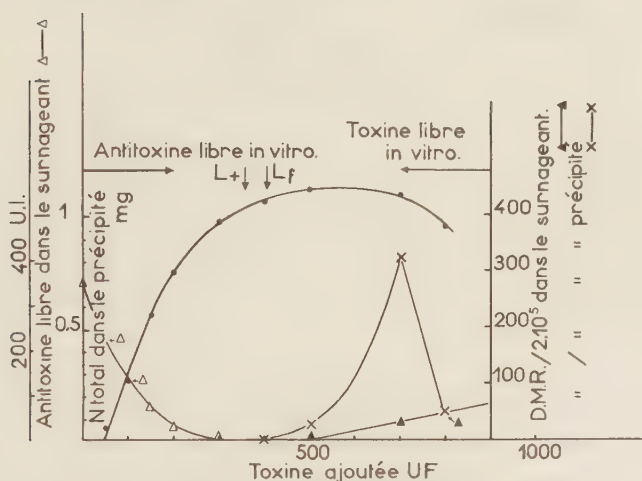
La courbe de précipitation quantitative est du type cheval, la pureté immunologique (2 440 UF/mg N), calculée à l'aide de la pente, ne correspond pas à celle d'une toxine pure. Nous remarquons à nouveau dans les surnageants, la présence d'antitoxine libre « *in vitro* » jusqu'au début de la zone rectiligne et d'antitoxine libre « *in vivo* » tout au long de la première partie de la pente jusqu'au point L_+ , enfin la présence de toxine libre « *in vivo* » ainsi qu'« *in vitro* » après le maximum de la courbe. Le précipité est toxique à partir du point L_+ .

Nous présentons cet exemple comme l'un des plus caractéristiques, tel qu'on le rencontrera le plus souvent avec des anticorps de chevaux hyperimmunisés et purifiés et où le seul système réagissant est celui de la toxine et de l'antitoxine.

12. ÉTUDE DES COURBES DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE DES SÉRUMS DE CHEVAUX SANS IMMUNITÉ DE BASE (A SCHICK POSITIF)

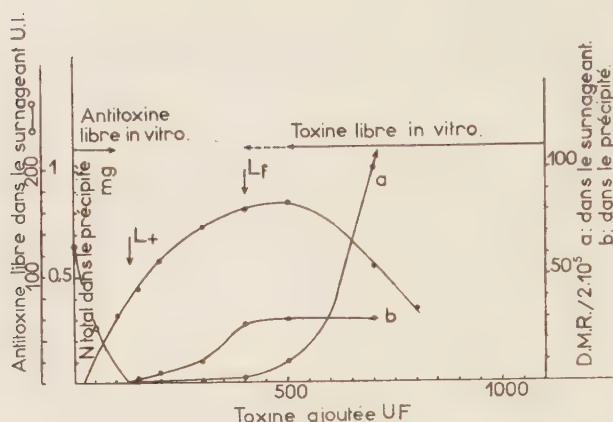
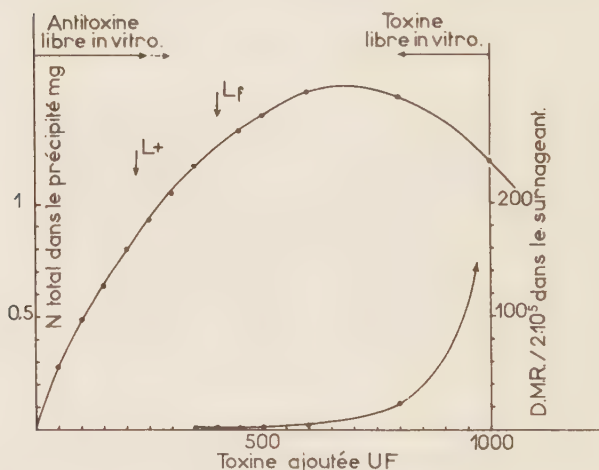
Les antitoxines obtenues chez des chevaux sans immunité de base présentent pendant une très longue période des rapports *in vivo/in vitro* très bas, bien qu'ils contiennent des quantités appréciables de γ -globulines. La courbe de précipitation quantitative a été faite avec plusieurs de ces sérums.

Les figures 31, 32 et 33 montrent les résultats obtenus avec les sérums 854 et 825. La courbe est du type précipitine. Les précipités sont toxiques à partir du point L_+ qui se trouve à gauche du point L_f et le maximum de la courbe. Il y a de la toxine libre dans le surnageant à partir du maximum de la courbe. Ce phénomène est semblable à ce qui a déjà été observé dans certains systèmes enzymes-antienzymes, où l'activité enzymatique peut persister entièrement ou partiellement dans le précipité spécifique (46, 47, 48, 49). Sur la base des résultats

FIGURE 31. Sérum 854; Saignée du 25^e jour; Courbe 25.FIGURE 32. Sérum 854; Saignée du 60^e jour; Courbe 26.

publiés, il a été admis que dans le système toxine-antitoxine, le pouvoir neutralisant évolue toujours parallèlement au pouvoir précipitant.

Pour vérifier si la forme de la courbe est influencée par la quantité élevée des globulines γ présentes dans ces antitoxines ou si ces sérums sont tous de type précipitine, nous avons fractionné les sérums et de nouveau effectué les courbes de précipitation quantitative avec les fractions riches en γ et β -2 globulines. Le fractionnement a été fait par le sulfate d'ammonium suivant la technique déjà décrite. Les résultats (fig. 34 et 35) montrent que les β -2 globulines présentent de nouveau une courbe de type cheval. Nous voyons donc encore une fois que la forme d'une courbe de précipitation quantitative est déterminée par la

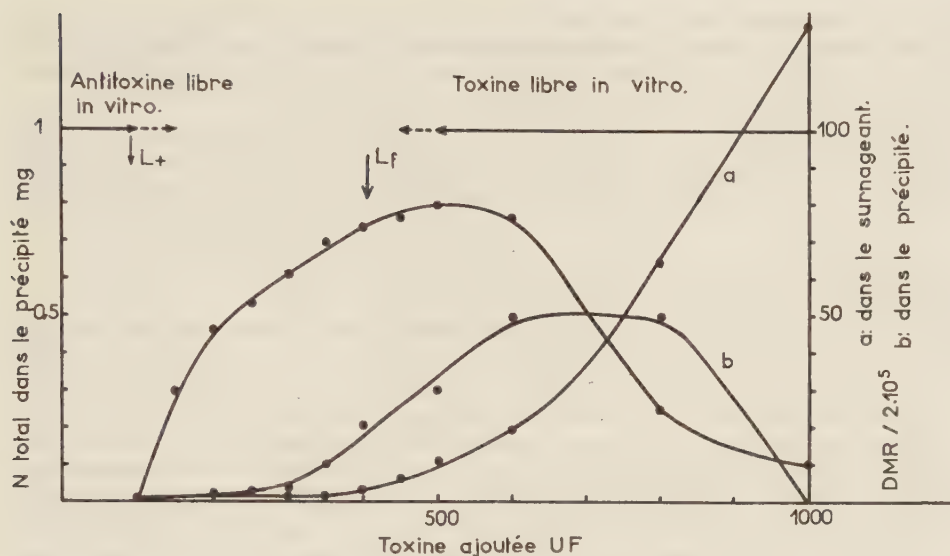
FIGURE 33. Sérum 825; Saignée du 39^e jour; Courbe 27.FIGURE 34. Sérum 825; Saignée du 39^e jour; Fraction 0-33%; Courbe 28.

mobilité électrophorétique des anticorps présents dans le sérum. Les précipités de la fraction β -2-globulines sont toxiques dès le début de la courbe.

Notons également la présence d'anticorps libre « *in vitro* » après le point L_+ ; nous montrerons plus loin qu'il s'agit d'anticorps dépourvus de pouvoir neutralisant.

13. DISCUSSION DES PREMIERS RÉSULTATS

Les divers types d'antitoxines réagissent de façon tout à fait différente, ce qui se manifeste par : a) la solubilité des complexes formés; b) la neutralisation de la toxine; c) la quantité totale de précipité formé.

FIGURE 35. Sérum 825; Fraction β -2; Courbe 29.

On admet en général que la liaison entre l'anticorps et les groupes « haptènes » spécifiques est due aux forces de Coulomb, aux forces de van der Waals et aux liaisons hydrogène. Les anticorps sont considérés comme étant bivalents et les antigènes polyvalents; ils forment des agrégats qui deviennent de plus en plus grands jusqu'à ce qu'ils atteignent « un point critique », ainsi désigné par Stockmeyer; ils s'unissent alors entre eux et précipitent (92). La précipitation tient donc à l'insolubilité des complexes, ce qui est certainement en rapport avec la solubilité propre des constituants, l'antigène et l'anticorps. Les γ -globulines sont moins solubles que les globulines β -2 et il est probable que ce sera aussi le cas pour leurs complexes; c'est la raison pour laquelle les γ -globulines précipitent dans la zone d'excès d'anticorps où les β -2 globulines sont solubles. L'insolubilisation des complexes et la neutralisation des groupes antitoxiques sont des phénomènes tout à fait différents.

Les antitoxines sont en réalité des mélanges d'anticorps dirigés contre les divers groupes spécifiques de l'antigène, en l'occurrence la toxine.

La multiplicité éventuelle des anticorps engendrés par un antigène unique a déjà été observée et peut être démontrée par des tests de diffusion en gélose, par des tests d'adsorption et surtout par la digestion de l'antigène (voir chapitre VII).

Pope a démontré qu'une toxine qui donne une ligne par les tests de diffusion en gélose, en donne plusieurs après digestion. Nous pensons qu'un antisérum contient des anticorps dirigés contre divers groupes spécifiques de la toxine. Les morceaux de molécule obtenus après digestion et contenant ces groupes spécifiques réagissent alors comme des antigènes distincts vis-à-vis des anticorps spécifiques et donnent plusieurs lignes de précipitation. Avec ces données, il est possible de reconstituer quatre types extrêmes d'antitoxines :

1°) Les antitoxines ayant une mobilité électrophorétique identique à celle des γ -globulines et contenant beaucoup d'anticorps spécifiquement dirigés contre le groupement toxique de la molécule de toxine. Le rapport *in vivo/in vitro* de ces antitoxines est élevé, en général supérieur à 1,5.

2°) Les anticorps ayant une mobilité électrophorétique identique à celle des γ -globulines et contenant peu d'anticorps spécifiquement dirigés contre le groupement toxique de la molécule. Le rapport *in vivo/in vitro* de ces antitoxines est bas, inférieur à 0,50.

3°) Le mélange d'anticorps identiques à ceux du premier groupe, mais ayant une mobilité électrophorétique des β -2 globulines.

4°) Les anticorps identiques à ceux du deuxième groupe, mais ayant une mobilité électrophorétique des β -2-globulines.

La réaction de précipitation quantitative obtenue avec les antitoxines appartenant au premier groupe, est représentée par les courbes n^{os} 3, 6, 8, 18, 19, 20.

Considérons la courbe 18. Nous voyons qu'il y a un précipité dans toute la zone d'excès d'anticorps. Jusqu'au point L_+ , le surnageant contient de l'antitoxine libre *in vivo*, mais on en trouve seulement jusqu'au point 320 par la diffusion en gélose. Entre ce point et le point L_+ , l'antitoxine libre n'est plus mise en évidence par les tests *in vitro*. En augmentant la quantité de toxine, il y a progressivement coprécipitation jusqu'au maximum de la courbe. Le point L_+ se situe après le maximum de la courbe et seulement au-delà, on retrouve de la toxine dans le surnageant.

Les précipités sont faiblement toxiques dans la partie descendante de la courbe et ne contiennent pas un excès de toxine comme dans le cas des courbes ayant un rapport *in vivo/in vitro* inférieur à 1.

Avec des antitoxines aux rapports *in vivo/in vitro* faibles et appartenant au deuxième groupe, la réaction se fait de la même façon, mais les anticorps antigroupes toxiques sont peu nombreux. Le point L_+ se trouve à gauche du maximum et à gauche du point L_f . On trouve de l'antitoxine libre *in vitro*, même après le point L_+ . A partir de ce point les précipités sont de plus en plus toxiques. Il semble donc qu'il y ait présence d'un anticorps précipitant pouvant se combiner à la toxine mais ne neutralisant pas le groupement toxique de la molécule. Ces anticorps sont donc dirigés contre d'autres groupes antigéniques de la toxine. Bien que les surnageants soient toxiques à partir du point L_+ , les quantités retrouvées restent faibles pour augmenter après avoir dépassé le maximum de la courbe. La plus grande partie de la toxine non neutralisée se retrouve dans le précipité entre le point L_+ et le maximum de la courbe.

Examinons les courbes obtenues avec des anticorps ayant une mobilité de β -2 globulines. Aucun des sérums que nous avons préparés n'a présenté les caractères des groupes extrêmes trois et quatre. Nous avons pu isoler des anticorps appartenant à ces deux groupes à partir des sérums contenant des mélanges d'anticorps de mobilité β -2 et γ ayant les caractères recherchés. La fraction β -2 du sérum 825 (saignée du 39^e jour) est un exemple d'anticorps appartenant au groupe 4.

Nous voyons (courbe n^o 29) que dès le début de la courbe, les surnageants et précipités sont toxiques. Il y a de nouveau présence d'anticorps libres décelables par la diffusion en gélose après le point L_+ . Les surnageants sont peu toxiques jusqu'au maximum de la courbe, mais ensuite la toxicité augmente beaucoup. A

partir du sérum 441 (saignée du 43^e jour), nous avons pu isoler une fraction d'anticorps riche en β -2 globulines, ayant un rapport *in vivo/in vitro* élevé. La courbe de précipitation quantitative (fig. 36, courbe n° 30) présente les aspects attendus pour une quantité élevée d'anticorps neutralisants. On retrouve de l'antitoxine libre dans le surnageant jusqu'au point L_+ ; ce point est situé à droite du point L_r . Les précipités sont seulement toxiques dans une région qui se trouve à droite du point L_+ . Tous ces exemples montrent donc que les rapports *in vivo/in vitro* des anticorps, l'insolubilisation des complexes ainsi que leur mobilité électrophorétique dépendent de la nature des anticorps présents.

Entre les quatre groupes extrêmes décrits, existent de nombreuses possibilités intermédiaires. Les antitoxines généralement rencontrées et étudiées proviennent de chevaux hyperimmunisés pendant une très longue période, il en résulte que ces préparations sont en grande partie de type β -2 globulines, avec des rapports *in vivo/in vitro* voisins de 1.

Examinons les courbes obtenues avec ces types d'antisérums (courbes n°s 1, 2, 12, 13, 15 et 16). Les surnageants contiennent pour certains points de la courbe de l'antitoxine libre qu'on ne peut pas mettre en évidence par les tests de diffusion en gélose. A partir du point L_+ , le précipité devient toxique. La pente de la droite reste très faible, ce que Pappenheimer explique en admettant que l'augmentation de la courbe correspond à la quantité de toxine ajoutée. Nous remarquons que ce n'est pas tout à fait le cas pour le début de la courbe où on trouve encore de l'antitoxine libre dans le surnageant. Mais à partir du point L_+ , les précipités deviennent toxiques, le surnageant ne contient que des traces de toxine. La différence entre l'augmentation du précipité et la quantité de toxine ajoutée reste faible et laisse donc supposer que l'hypothèse de Pappenheimer est juste. Les précipités des anticorps β -2 peuvent donc contenir des quantités variables de toxine. La présence de complexes solubles au début de la pente, lesquels sont également précipités avec des quantités plus grandes de toxine, peut donc être la raison pour laquelle la pente ne correspond pas exactement à la toxine ajoutée.

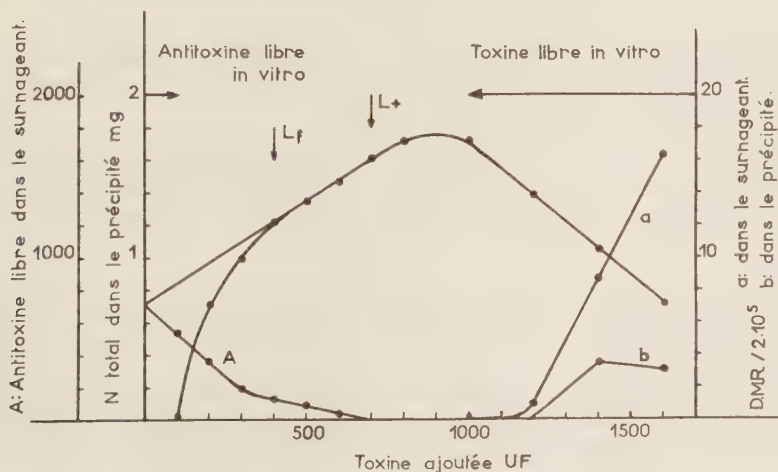


FIGURE 36. Courbe 30; Sérum 441; Fraction β -2.

Pour vérifier d'une façon plus exacte l'hypothèse de Pappenheimer et pour déterminer en même temps la présence d'anticorps non précipitants dans les diverses antitoxines étudiées, nous avons refait l'étude quantitative de certaines antitoxines à l'aide d'une toxine radioactive.

14. ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE AVEC DES TOXINES MARQUÉES

La préparation d'une toxine radioactive peut se faire par deux méthodes. La première consiste à cultiver le bacille diphtérique sur un milieu radioactif et à purifier la toxine ainsi obtenue. La deuxième technique consiste à marquer une toxine pure avec de l'iode radioactif.

Nous avons d'abord essayé la première méthode et cultivé le bacille diphtérique sur notre milieu habituel, en ajoutant au milieu de la ^{35}S -L-méthionine. La radioactivité de la toxine ainsi obtenue était trop faible pour pouvoir faire les expériences prévues. Nous avons ensuite employé la deuxième technique et préparé des dérivés iodés de la toxine pure. Il a été démontré que la toxine peut être transformée par l'iode en un dérivé non toxique tout en gardant son activité immunisante. Ces toxines iodées ont été utilisées pour l'hyperimmunisation des animaux (cf. chapitre V). Notre but était de préparer un dérivé iodé où la quantité d'iode incorporée serait faible afin que la préparation, étant radioactive, soit encore toxique.

L'étude de la réaction de précipitation quantitative a été faite en même temps que nous par Pappenheimer et Yoneda (214) qui ont obtenu les résultats suivants : Le bacille diphtérique a été cultivé sur milieu synthétique, spécialement mis au point pour ces études, contenant de la ^{35}S -L-méthionine. Avec la toxine radioactive ainsi obtenue et purifiée, et avec les filtrats de culture en excès de fer, il a été démontré que :

a) Le précipité obtenu dans les conditions suivantes n'est pas radioactif : 1) toxine diphtérique non marquée + milieu de culture radioactif + antitoxine diphtérique; 2) toxine diphtérique + protéines P radioactives + antitoxine; 3) protéines P radioactives + ovalbumine + sérum anti-ovalbumine.

b) La quantité de radioactivité précipitée par le sérum 5353 AD est la même si l'on utilise une toxine radioactive brute ou une toxine radio-active purifiée. Ces expériences montrent donc que le précipité spécifique ne contient pas d'antigènes autres que la toxine.

c) La courbe d'impulsions obtenue avec la toxine radioactive présente le même aspect que celle faite avec la toxine inerte. Le pourcentage des protéines non toxiques présentes comme impuretés dans le surnageant, dans la limite des précisions expérimentales, est constant. La courbe de radioactivité du surnageant présente une pente qui passe par l'origine. 87,5 % de la toxine ajoutée sont précipités par l'antitoxine; la pureté immunologique calculée de la même préparation est de 83 %; ces valeurs sont donc très proches.

Diverses techniques ont été essayées pour préparer des dérivés iodés de la toxine. Nous nous sommes rendus compte que les quantités d'iode à ajouter doi-

vent être très rigoureusement déterminées. Dans un premier temps, la toxine, tout en gardant son pouvoir floculant, se transforme en anatoxine; si les quantités d'iode sont encore plus grandes, la toxine perd son pouvoir floculant. Au contraire une ioduration trop faible donne des dérivés peu radioactifs.

La technique finalement adoptée est basée sur celle employée par Masouredis (169), méthode également employée par Burtin (39) pour le marquage de la sérum-albumine humaine.

Nous avons d'abord déterminé la quantité d'iode à ajouter à la toxine pour que celle-ci ne subisse aucune dénaturation. Nous avons ajouté à 1 ml d'une solution de toxine titrant 750 UF/ml, $1,18.10^8$ D.M.R./ml et 3 000 UF/mg N, 1 ml de diverses dilutions d'une solution contenant 80 mg d'iode dans 10 ml de solution IK 0,1 M. Les mélanges restent 24 h à la température ordinaire et sont ensuite dialysés. Après dialyse, le volume est ajusté à 10 ml et les activités *in vivo* et *in vitro* sont déterminées. Le tableau 15 montre que 1 ml de la dilution 1/50 ajoutée à 1 ml de toxine ne la dénature pas et peut être employé.

TABLEAU 15

Toxine	Dilution solution I + IK	UF total	K _f	D.M.R. total
1 ml	1 ml non dilué	ne flocule pas	—	< 10 ²
1 ml	1 ml dilué au 1/5	ne flocule pas	—	< 10 ²
1 ml	1 ml dilué au 1/10	400	1 h	< 10 ³
1 ml	1 ml dilué au 1/50	700	environ 2'	$1,1.10^8$

L'iode radioactif ^{131}I dont nous pouvions disposer était livré sous forme d'une solution de INa contenant du bisulfite et la technique suivante de marquage a été finalement adoptée: A 1 ml d'une solution d'iodure radioactif, activité 1 mc (forme chimique INa, pH = 8-9; CO_3NaH M/50; CO_3Na_2 M/400; $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ M/400) on ajoute 1 ml de la solution suivante:

Iode bisublimé	32 mg
Iodure de potassium	167 mg
H ₂ O q.s.p.	100 ml

Les deux solutions sont mélangées et on ajoute ensuite 1 ml d'une solution d'iodate de potassium contenant 535 mg IO_3K par litre et ensuite 4 ml H_2SO_4 N/70. La quantité d'iode libérée correspond à celle à ajouter à 10 ml de toxine. On ajoute au mélange obtenu 1 ml d'une solution de IK contenant 2,32 g IK par litre et 2 ml de tampon phosphate.

Dans un premier temps, nous avons mélangé à volume égal, la solution d'iode radioactif et une solution de toxine titrant 750 UF/ml, dialysée contre du tampon phosphate. La radioactivité obtenue était élevée, jusqu'à 500 cps par minute et par UF. Puisque quelques préparations ont montré une baisse de la toxicité, nous avons, dans les mêmes conditions, ajouté à la toxine suivant les expériences, la solution radioactive diluée de moitié ou au quart dans le tampon phosphate; dans ces conditions, la toxicité de la préparation est conservée.

La préparation radioactive est dialysée pendant une nuit contre de l'eau du robinet et ensuite pendant 24 heures contre 5 litres de tampon phosphate. Le liquide extérieur est renouvelé une fois.

La radioactivité des échantillons a été déterminée sur des échantillons de 0,15 à 0,25 ml dans un compteur Philips type 4035. La radioactivité non protéique des préparations était basse: environ 12 cps minute par ml. Les courbes de précipitation quantitative ont été établies dans les conditions standards déjà décrites. La radioactivité totale des précipités et des surnageants a été déterminée en même temps que celle de la toxine employée. Le précipité a été dissous dans l'acide acétique 0,25 N, volume final 2,5 ou 5 ml.

La figure 37 montre les résultats obtenus avec le sérum 906 et nous voyons que les courbes de radioactivité sont analogues à celles publiées par Pappenheimer et Yoneda (214). La courbe de radioactivité présente une pente correspondant à celle du précipité spécifique.

La toxine employée titrait 2900 UF/mg N. Se basant sur une valeur de 3100 UF/mg N pour une toxine pure, on peut calculer que la préparation contenait environ 6 % d'impuretés. Nous voyons que ce chiffre ne correspond pas aux valeurs trouvées avec le sérum 906, le précipité contient 82 % de la radioactivité.

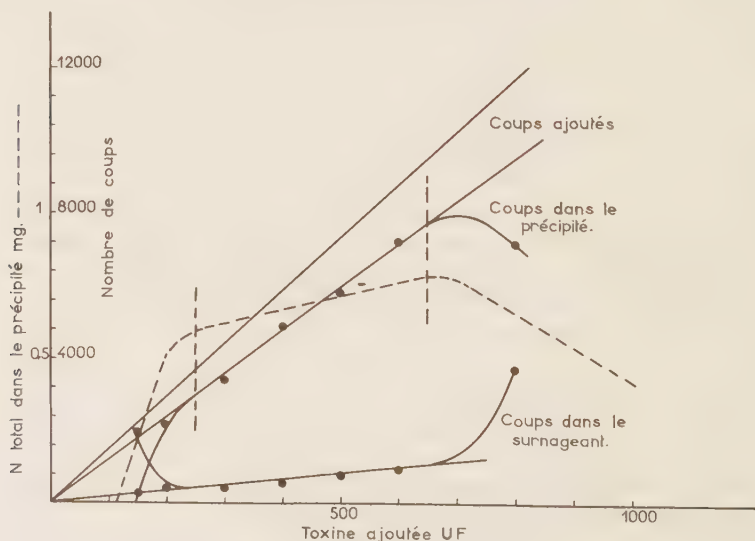


FIGURE 37. Sérum 906.

Le tableau 16 montre les résultats obtenus avec d'autres sérums antidiphthériques et la même préparation de toxine.

TABLEAU 16

<i>Antitoxine</i>	<i>% de radioactivité retrouvé dans</i>	
	<i>le précipité</i>	<i>le surnageant</i>
906 ^a	82	14
1 451 ^b	94	12
441 ^c	89,5	12
825 ^d	69	27
341 ^e	85,5	10,8
341 ^f	86,5	11,3

^a. 906 : sérum commercial, mélange de sérums de divers chevaux hyper-immunisés, purifié par digestion enzymatique.

^b. 1451 : saignée du 82^e jour.

^c. 441 : saignée du 43^e jour.

^d. 825 : saignée du 39^e jour.

^e. 341 : saignée du 11^e jour.

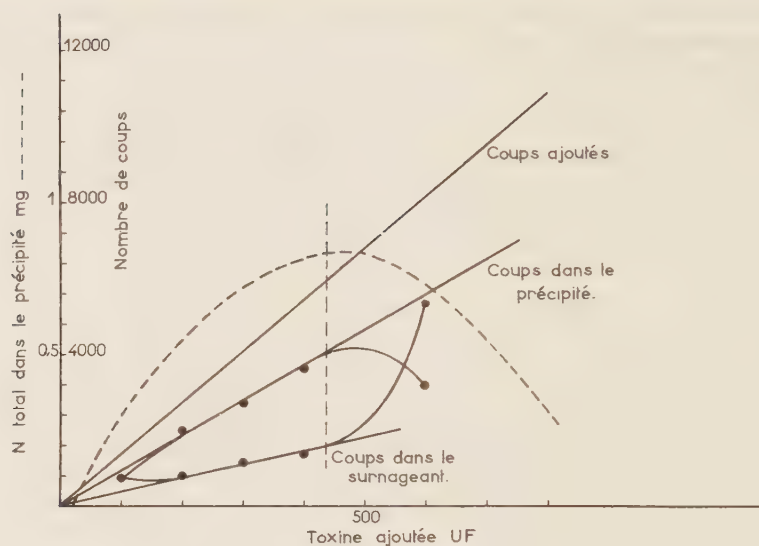
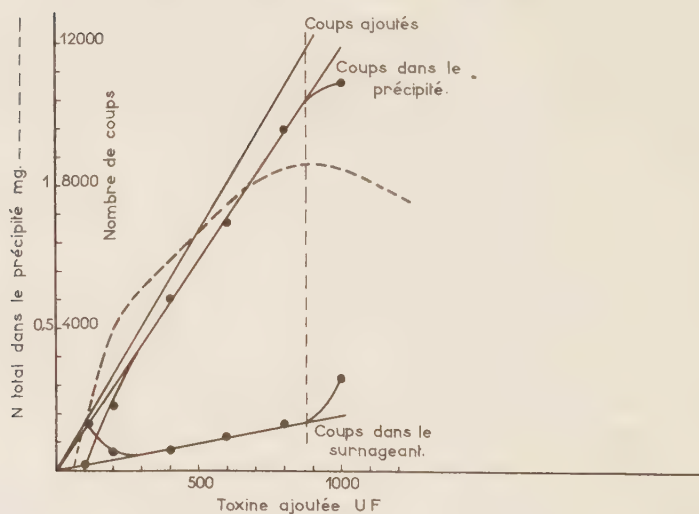
^f. 341 : saignée du 38^e jour.

La quantité de toxine précipitée par les diverses antitoxines n'est pas la même. L'antitoxine qui précipite le plus grand pourcentage de toxine est le n° 1451. 94 % de la toxine ajoutée se retrouve dans le précipité. Nous avons déjà vu que la pureté immunologique, calculée à l'aide de la pente de zone rectiligne est voisine de celle d'une toxine pure. L'antitoxine qui contient la plus grande quantité d'anticorps non précipitants est le sérum 825. Le pouvoir antitoxique de cette saignée de début d'immunisation chez un cheval sans immunité de base est bas. Il est probable que les préparations de ce type contiennent toutes une quantité élevée d'anticorps non précipitants. Les autres antitoxines étudiées contiennent également toutes des anticorps non précipitants en quantités non négligeables.

Les figures 38 et 39 montrent des courbes de radioactivité faites avec les sérums 825 et 441. L'augmentation de la radioactivité dans le surnageant ainsi que dans le précipité, par rapport aux unités de floculation ajoutées, est linéaire jusqu'au maximum des courbes; pour les valeurs comprises entre 150 et 450 UF pour le sérum 825, de même que pour les valeurs comprises entre 250 et 850 UF pour le sérum 441, les quantités de toxine précipitée sont proportionnelles aux quantités ajoutées.

Nous avons observé le même fait avec toutes les autres antitoxines étudiées, ce qui implique que la répartition de la toxine entre les complexes précipitants et non précipitants, se fait indépendamment de la quantité de toxine ajoutée, mais dépend de la préparation d'antitoxine employée.

Les pentes des courbes de précipitation quantitative étudiées avec les anticorps de type β -2 globulines ne correspondent en général pas à celles d'une toxine pure. Les quantités de toxine précipitée sont proportionnelles aux quantités ajoutées mais toute la toxine ajoutée n'est pas précipitée. Les valeurs calculées à l'aide de la pente doivent donc être supérieures à 3 000 UF/mg N, à condition que la quantité d'anticorps dans le précipité reste constante tout au long de la zone rectiligne.

FIGURE 38. Sérum 825; Saignée du 39^e jour.FIGURE 39. Sérum 441; Saignée du 43^e jour.

Nous pensons que les quantités absolues d'anticorps précipités au début de la zone rectiligne sont moins élevées qu'à la fin, raison pour laquelle on trouve des valeurs inférieures à 3 000 UF/mg N. L'existence d'antitoxine dans le surnageant au début de la courbe a déjà été démontrée par le titrage *in vivo* des anticorps. Ce dernier fait se démontre aussi d'une manière indiscutable avec les anticorps de type γ -globulines, où tout au long de la courbe, la quantité de précipité spécifique

augmente considérablement; la quantité de toxine précipitée est proportionnelle à la toxine ajoutée, mais la plus grande partie de l'azote du précipité provient de l'anticorps. Il est possible que tout au long de la zone rectiligne le même phénomène se produise, mais d'une façon moins marquée, la différence d'azote anticorps entre le début et la fin de la pente étant faible. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé, par la technique employée pour la toxine, des antitoxines marquées à l'iode radioactif. La radioactivité des précipités ne nous renseigne pas sur les quantités totales d'anticorps, mais indique si cette quantité augmente ou reste la même.

La figure 40 montre les résultats obtenus avec les sérums 441 (saignée du 43^e jour) et 906. Nous voyons que dans le cas d'un sérum contenant des gamma-globulines (tel que le 441), la quantité d'anticorps dans le précipité augmente tout au long de la courbe jusqu'au maximum. Dans le cas du sérum 906, la quantité d'anticorps contenus dans le précipité augmente au début de la courbe, reste ensuite presque constante, pour finir par baisser à nouveau. La différence faible entre le début et la fin de la droite nous semble donc être l'une des raisons pour laquelle on ne trouve pas de droite correspondant à celle de la toxine. Une solution de ce problème nous a semblé possible avec une préparation d'anticorps uniquement de type β -2-globulines et 100 % précipitants. L'obtention d'une préparation ayant ces caractères est difficile. On peut envisager, comme nous l'avons fait, d'éliminer les γ -globulines par précipitation saline ou par des techniques semblables, mais il a été démontré que ces purifications transforment souvent une partie des anticorps précipitants en anticorps non précipitants.

Pope (232) a montré que les courbes faites en présence de sulfate d'ammonium sont du type précipitine; le précipité obtenu est plus élevé qu'en milieu physiologique et la courbe passe par l'origine. Nous avons pensé trouver dans ce phénomène la clef d'une solution à ce problème, qui serait donc la précipitation des

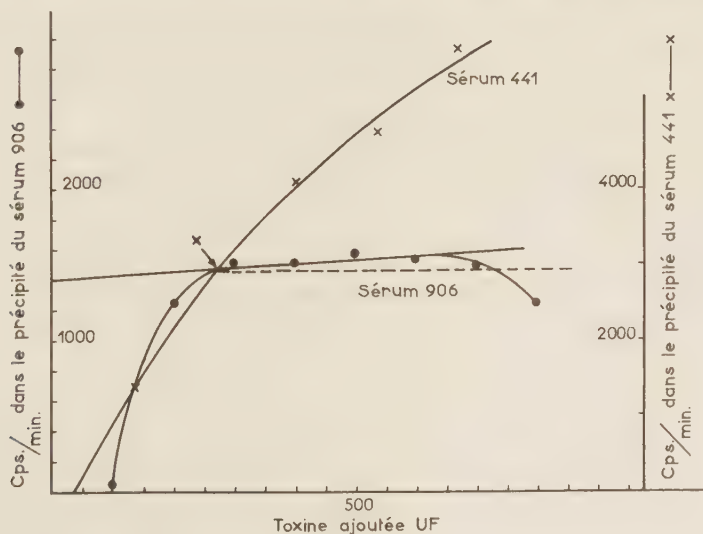


FIGURE 40

complexes solubles présents tout au long de la pente de la courbe. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons refait certaines courbes déjà étudiées, en présence de phosphate mono-dipotassique à $\text{pH} = 6,8$, pour des concentrations finales de 1 et 1,4 M.

Le sérum tout d'abord a été précipité par ces concentrations de sel; la fraction soluble a été utilisée pour étudier la précipitation quantitative. Nous avons également étudié dans les mêmes conditions les courbes de précipitation quantitative avec des anticorps obtenus par digestion du précipité spécifique. Par cette voie, il a été possible d'obtenir des préparations contenant uniquement l'antitoxine antidiphthérique, ce qui a permis d'étudier les courbes avec des toxines de pureté variable. Le seul système précipitant reste celui de la toxine et de l'antitoxine. Nous décrivons d'abord la préparation de ces anticorps et ensuite les réactions de précipitation quantitative en milieu salin concentré.

15. PURIFICATION DES ANTITOXINES PAR DIGESTION DU PRÉCIPITE SPÉCIFIQUE

Après avoir mis au point la réaction de floculation, Ramon (241) étudia également la dissociation du complexe et réussit à récupérer l'antitoxine contenue dans le floculat. Le précipité spécifique est dissocié par l'acide acétique et l'action de la chaleur permet de détruire la toxine plus fragile. L'antitoxine ainsi obtenue a conservé son activité *in vivo*, titre 60 à 80 000 unités par gramme de protéine, mais ne flocule plus. Le rendement est d'environ 75 %. Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs (146, 164, 174). La dissociation par digestion enzymatique du floculat toxine-antitoxine a été décrite en même temps par Pope et Healey d'une part, et Sandor d'autre part.

Pope et Healey (224) digèrent par la pepsine, le floculat de la toxine et d'une antitoxine purifiée, à 18°C et $\text{pH} = 3$, pendant 30 minutes. La digestion est suivie d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium et le produit obtenu titre 135 000 unités d'antitoxine par gramme de protéine.

Sandor (264, 265) a digéré, à 37° , les floculats toxine-antitoxine par la pepsine purifiée en milieu faiblement acide, pendant trois jours. Les rendements sont de 25 à 35 pour 100. L'antitoxine dissociée titre en moyenne 33 unités par mg de protéine. Une augmentation de l'activité est obtenue à l'aide d'une coagulation sélective.

Northrop (191, 192) étudia la digestion du floculat par la trypsine. Après fractionnement répété avec du sulfate d'ammonium, il réussit à cristalliser l'antitoxine. Le produit obtenu titrait *in vivo* 700 unités par milligramme d'azote protéique et *in vitro* 700 à 900 unités. Les propriétés physico-chimiques de cette antitoxine ont été étudiées par Rothen (258). La constante de sédimentation est $5,5 \cdot 10^{-13}$ sec., la constante de diffusion $5,7 \cdot 10^{-7}$ $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ et le poids moléculaire 90.500. Le produit obtenu n'était pas très stable. Pope et Stevens (227, 231) pensèrent que la raison en était des traces de trypsine présentes dans les préparations. Une étude détaillée de la pepsine a démontré que les préparations contenaient un autre enzyme appartenant au groupe des cathepsines, provoquant la digestion à $\text{pH} = 3,8$. Les préparations cristallisées de trypsine contenaient également des traces de cet enzyme.

Peterman (218, 219) a montré que la molécule d'antitoxine est coupée en deux par les enzymes. Il est possible de couper ces morceaux en fragments plus petits par des digestions plus poussées.

Pope *et al.* (226) ont établi, par la technique de diffusion en gélose, que ces anticorps purifiés sont loin d'être purs et contiennent, outre l'antitoxine, encore plusieurs autres anticorps non spécifiques. Il y a donc plusieurs systèmes antigène-anticorps qui précipitent et sont ensuite digérés, et les préparations purifiées doivent contenir tous les anticorps qui précipitent en même temps que l'antitoxine. Il est possible de supprimer la plus grande partie des anticorps non spécifiques par traitement de ces préparations avec des protéines d'une culture de bacille diphtérique en excès de fer. Le nombre d'anticorps est réduit à deux.

Pope et Stevens arrivèrent par la technique de précipitation des anticorps accessoires avec leurs antigènes spécifiques à des préparations contenant 211.000 unités par gramme de protéine. Mais ces préparations ne sont pas pures et il est possible de pousser la purification plus loin et de supprimer encore d'autres anticorps non antitoxiques (229, 230). L'antitoxine ainsi obtenue donne peu de précipité avec la toxine et le rapport *in vivo*/*in vitro* de ces préparations est élevé.

Une technique permettant l'emploi industriel a été récemment décrite par Yeu et Pavageau (310). Ils obtinrent des préparations qui titraient 786 unités de floculation par milligramme d'azote; le rendement était de 46 %.

Nous nous sommes proposés de purifier l'antitoxine diphtérique par digestion du précipité spécifique pour les raisons suivantes :

a) Dans tous les sérums antidiphtériques, il y a des anticorps non précipitants. Ces anticorps se combinent également à la toxine, mais le complexe formé étant soluble, la quantité de toxine présente dans le précipité est moindre que la totalité de toxine ajoutée. Dans l'étude des courbes de précipitation quantitative, il y a donc toujours une partie de la toxine ajoutée qui ne précipite pas. L'utilisation des anticorps obtenus par digestion du précipité spécifique implique donc que ces anticorps sont précipitants, sauf dénaturation pendant la purification qui les transforme de nouveau en anticorps non précipitants.

b) Des sérums obtenus par l'hyperimmunisation des chevaux avec des toxines purifiées, tels que les sérums 1451 (saignée du 82^e jour), 341 (saignée du 38^e jour), contiennent outre l'antitoxine, d'autres anticorps accessoires mais en faible quantité. Il est donc peu probable que l'optimum de précipitation de la toxine et des impuretés se trouve dans les mêmes proportions de toxine et de sérum. L'antitoxine obtenue après digestion du précipité spécifique à l'optimum de floculation contiendra donc moins d'anticorps accessoires et il a même été possible d'obtenir des préparations qui contiennent uniquement l'antitoxine.

Technique employée

On détermine d'abord sur une petite quantité d'anatoxine la quantité de sérum à ajouter pour l'optimum de floculation. Le mélange correspondant à ces proportions reste 24 heures à 37°, est centrifugé et deux fois lavé avec du tampon phosphate M/15, NaCl 0,172 M, pH = 6,8. On utilise environ 1 ml de tampon pour 1 000 unités de précipité. Le précipité lavé est ensuite mélangé à une solution de phosphate monopotassique M/20; la quantité de pepsine préalablement dissoute

est ajoutée et le pH ajusté à 3,2. Pour 100 000 unités de précipité, on ajoute 1 g de pepsine titrant 1 000 unités sous un volume final de 200 ml.

La solution reste 30 minutes à 34°. Après digestion, on ajoute 14 % de sulfate d'ammonium cristallisé. Le pH est ajusté à 4,2, la solution reste 1 heure à 48°. Le précipité formé est éliminé par centrifugation.

L'antitoxine digérée précipite à 32 % de sulfate d'ammonium (pH = 7) et est également recueillie par centrifugation. Les digestions sont faites sur des floculats de fractions contenant le même type d'antitoxine (β -2 ou γ). Les rendements obtenus varient entre 25 et 50 %. On trouve les caractères des antitoxines étudiées dans le tableau 19.

Nous avons déterminé la mobilité électrophorétique des antitoxines digérées par la technique d'immuno-électrophorèse. Il a été démontré (269) que les anticorps de type β -2 ont, après digestion, la mobilité des γ -globulines. L'immuno-électrophorèse des anticorps β -2 a déjà été étudiée par Williams (303). Nous avons obtenu les mêmes résultats, mais nous avons pu démontrer que la mobilité des anticorps de type γ -globulines est également abaissée; la mobilité des globulines gamma est inférieure à celle des β -2 digérées, mais la différence est faible.

16. ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE EN MILIEU SALIN CONCENTRÉ

Nous avons choisi comme sel le mélange de phosphates de potassium monodipotassique, pH = 6,8-7,0. La concentration finale en sel était 1 ou 1,4 M. Nous avons donné la préférence au sel de phosphate, car nous avons tenu à mesurer la quantité de précipité par une détermination de l'azote, ce qui n'aurait pas été possible si l'on s'était servi de sulfate d'ammonium. Les mélanges restent une nuit à 37° C et ensuite 24 heures à 0° C. Cette technique permet seulement d'étudier des sérums contenant des anticorps solubles pour ces concentrations en sel, donc des anticorps β -2 ou des anticorps digérés.

Nous avons étudié les systèmes suivants : a) sérum brut contenant peu d'anticorps accessoires - toxine pure; b) sérum obtenu par digestion du précipité spécifique (préparation à une zone) - toxine pure; c) sérum obtenu par digestion du précipité spécifique (préparation à une zone) - toxine brute; d) sérum complexe digéré (préparation commerciale contenant un nombre élevé d'anticorps accessoires) - toxine pure. Dans tous les cas, le seul système précipitant est celui du complexe toxine-antitoxine. Les résultats ont montré que toutes les valeurs des unités de floculation calculées à l'aide de la pente varient autour de 3 000 UF/mg N.

Le sérum brut choisi contenant peu d'anticorps accessoires est le 1451 (saignée du 82^e jour). Ce sérum contient presque uniquement des anticorps β -2 solubles dans la solution saline.

La figure 41 et le tableau 19 montrent les résultats obtenus dans les conditions ordinaires et en présence de sel à concentration 1,4 M. La courbe en présence de sel passe par l'origine. La quantité de précipité obtenu tout au long de la droite est plus élevée, l'insolubilisation dans la région d'excès d'anticorps se fait moins vite. La pureté immunologique de la toxine, déterminée par la pente de la droite, correspond à 3 000 unités de floculation par milligramme d'azote. Les courbes 32,

33, 34 (Fig. 42) nous permettent de comparer les courbes faites avec la même antitoxine préparée par digestion du précipité spécifique avec et sans sel. Le sérum digéré 1451-D contenait uniquement l'antitoxine, décelable par la technique de diffusion en gel. Nous voyons de nouveau que, opérant dans les conditions habituelles, la précipitation n'est pas complète.

Deux toxines purifiées donnent, dans la zone d'équivalence, tout à fait les mêmes résultats : les deux droites coïncident. Le précipité formé en l'absence de cette concentration saline élevée donne une courbe de type cheval classique (courbe 32);

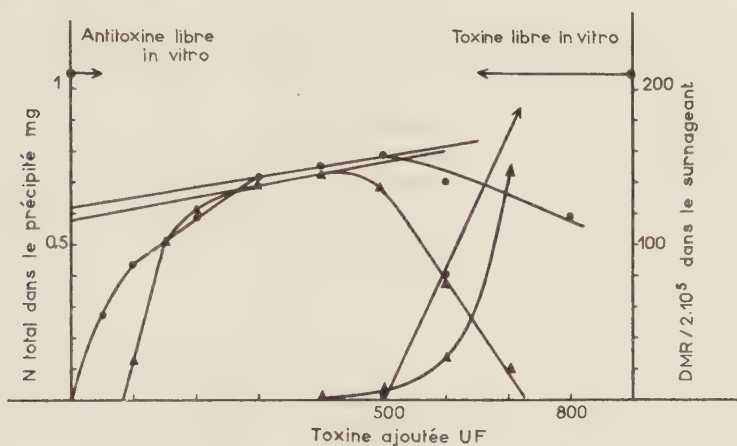


FIGURE 41. ● Courbe n° 31; ▲ Courbe n° 2.

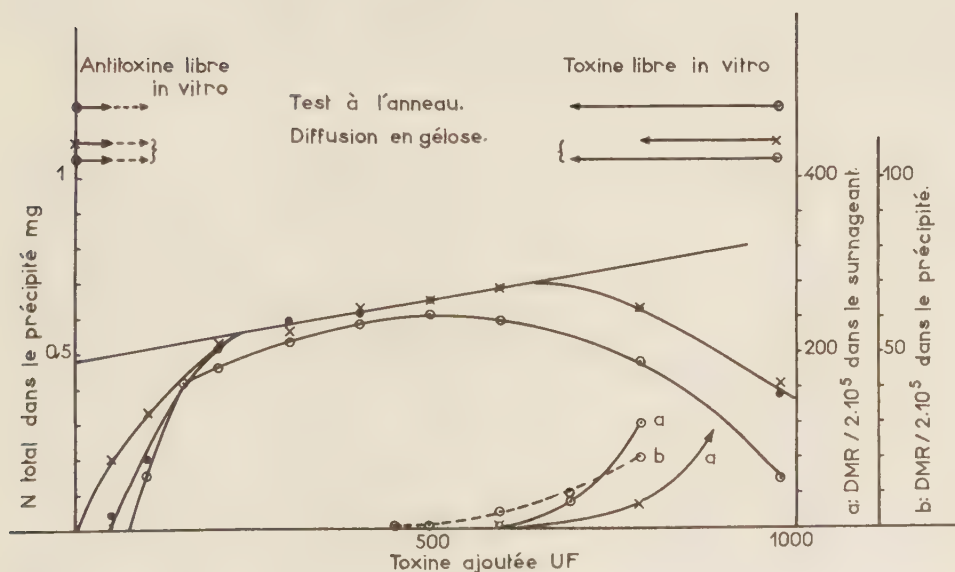


FIGURE 42. ○ Courbe n° 32; ● Courbe n° 33; × Courbe n° 34.

les ordonnées tout au long de la pente sont moins élevées, comparées à celles des courbes 33 et 34.

Les courbes 35, 36 et 37 sont faites avec une autre préparation du sérum 1451 digéré à partir du précipité spécifique. On calcule de nouveau environ 3 000 unités de floculation par mg N, bien que l'une des toxines utilisées soit une préparation brute concentrée contenant donc tous les antigènes présents dans le filtrat de culture de *Corynebacterium diphtheriae*. Il reste dans ce cas trois observations à faire :

a) Les droites des trois courbes, bien que leur pente soit à peu près la même, ne coïncident pas exactement. Nous pensons que ceci est dû au fait que les floculations des toxines ne sont pas faites avec une précision supérieure à 5 %.

b) La solubilisation du précipité dans la zone d'excès d'antigène ne se fait pas de la même façon. Il est donc probable qu'un autre phénomène intervient.

On sait qu'il existe dans les filtrats bruts de culture du bacille diphtérique, à côté de la toxine non dénaturée, des toxines altérées, partiellement dénaturées. Elles présentent les propriétés suivantes : K_f prolongé; relargage à une concentration saline plus faible (63, 64, 132, 183, 206, 226). Il est donc possible que ces toxines altérées, partiellement dénaturées, jouent également un rôle dans la précipitation quantitative.

c) Si l'on compare les courbes 33 et 34 avec les courbes 35, 36 et 37 faites avec des préparations différentes du même sérum, on voit que la quantité d'azote antitoxique précipité avec la première préparation de sérum est moins élevée que dans le deuxième cas. Nous pensons que la digestion a été plus poussée dans le premier cas. On sait que pendant la digestion, les globulines sont d'abord coupées en deux et les fragments ensuite de nouveau coupés. Les diverses préparations peuvent contenir ces fragments de molécule en proportions différentes, ce qui se reflète dans l'azote antitoxique précipitable par la même quantité de toxine.

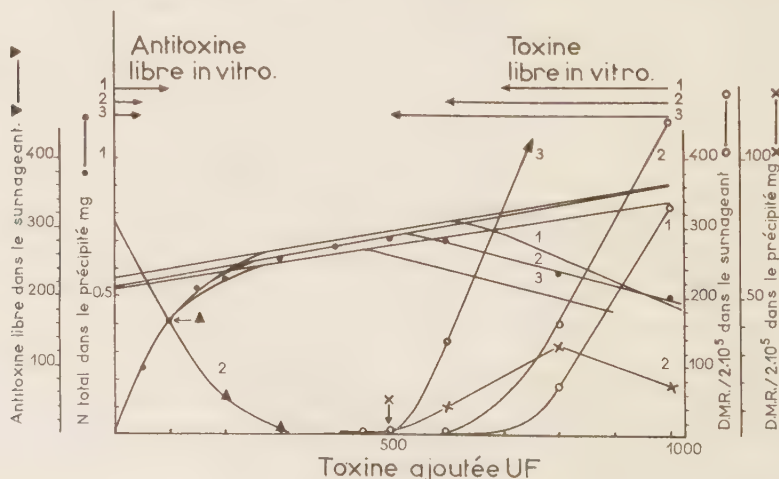


FIGURE 43. 1, courbe 36; 2, courbe 35; 3, courbe 37.

TABLEAU 17

Sérum	Saignée du (jour)	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	UF/mg N	Toxine	
						employée	calculée °
1451	82	1	23	0,89	45	290	805
1451	82	2	23	0,89	45	3000	2820
1451	M ^a	3	23	1,60	18,2	172	790
1451	82	4 ^b	23	0,89	45	290	—
441	17	5	24	2,90	11,8	290	490
441	17	6	24	2,90	11,8	2000	580
441	43	7	25	1,89	17	290	460
441	43	8	25	1,89	17	2000	455
441	43	9 ^b	25	1,89	17	290	—
341	11	10	26	1,37	11	290	1920
341	11	11	26	1,37	11	2780	1820
341	38	12	26	0,91	68	290	1310
341	38	13	26	0,91	68	2780	2260

^a. Mélange des sérums prélevés entre le 12^e et le 43^e jour.

^b. Courbes faites dans des conditions 10 fois diluées.

^c. UF/mg N toxine calculée à l'aide de la pente de la zone rectiligne. Les toxines à 290 UF/mg N sont des préparations brutes concentrées par précipitation à l'acide métaphosphorique.

TABLEAU 18

Sérum	Saignée du (jour)	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	UF/mg N	Toxine	
						employée	calculée °
5353-AD		14	27	0,875	218	3080	2780
Cop. Floc.		15	27	1	132	3020	2325
Cop. Anti.		16	27	1	137	3020	1920
1451-β-2	82	17	27	0,85	93,5	3000	2500
441-γ (3)	43	18	28	2,30	17,7	3080	—
441-γ (1)	43	19	29	4,86	11	3000	—
441-γ (2)	43	20	29	2,50	16,9	3000	852
γ (2)-10 %		21	29	1,13	64,5	3000	704
γ (2)-30 %		22	29	1,38	39,7	3000	1070
γ (2)-50 %		23	29	1,75	28,7	3000	1300
906		24	30	0,88	97	2900	2440
854	25	25	31	0,38	24,8	3080	—
854	60	26	32	0,87	48	2600	—
825	39	27	33	0,32	47,50	2600	—
825-γ	39	28	34	0,56	25,60	2160	—
825-β-2	39	29	35	0,23	75	2580	—
441-β-2	43	30	36	1,75	29,40	3000	800

TABLEAU 19

Sérum	Saignée du (jour)	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	UF/mg N	Toxine		Tampon
						UF/mg N employée	calculée	
1451-1,4 M	82	31	41	0,85	45	3020	3120	1,4MK/K ₂
1451-D ^b	82	32	42	1	620	3080	2500	"
1451-D	82	33	42	1	620	3080	3000	1 M K/K ₂
1451-D	82	34	42	1	620	3020	3000	1,4MK/K ₂
1451-D	82	35	43	0,80	520	2600	2700	1 M K/K ₂
1451-D	82	36	43	0,80	520	3000	2940	1 M K/K ₂
1451-D	82	37	43	0,80	520	482	3120	1 M K/K ₂
L 5-D		38	44	0,92	54,5	2580	—	"
825	39	39	55	0,32	47,5	T.D.	—	"
441	43	40	56	1,89	17	T.D.	—	"
1451	82	41	57	0,89	45	T.D.	—	"
906		42	58	0,88	97	T.D.	—	"

^a. Conditions habituelles (tampon borate).

^b. 1451-D : sérum digéré à partir du précipité spécifique.

Nous avons fait la même étude avec un sérum aussi complexe que possible, le sérum 906, une préparation commerciale du sérum digéré par les voies habituelles (sans passer par le précipité spécifique). Cette antitoxine a été préparée à partir d'un mélange de sérums de divers chevaux hyperimmunisés avec une anatoxine non purifiée.

La courbe faite avec le sérum 906 présente deux pentes. Sur l'une des deux, on calcule 3 000 unités de floculation par mg N. Nous pensons que ces sérums, préparés à partir d'anticorps divers (β -2-globulines, γ -globulines, anticorps précipitants ou non précipitants), contenant des antitoxines peu homogènes, sont moins bons pour des études quantitatives.

Bien que les valeurs d'unités de floculation de la toxine par milligramme d'azote varient autour de 3 000, elles ne sont pas les mêmes. Nous pensons qu'il sera difficile d'obtenir des valeurs exactes reproductibles, la floculation ne pouvant se faire avec une précision supérieure à 5 %. En outre, de faibles différences dans les valeurs des précipités entraînent des fautes appréciables dans les calculs de la pureté immunologique de l'antigène employé.

17. ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE AVEC UN SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE DE LAPIN

Les anticorps antidiphtériques de lapin ont une mobilité électrophorétique égale à celle des γ -globulines. Il n'a pas été possible de déceler des anticorps de type

β -2-globulines, même après une très longue période d'immunisation. Nous avons voulu comparer la courbe de précipitation quantitative avec les courbes des chevaux que nous venons de décrire.

La figure 44, courbe n° 38, montre que la forme de la courbe est tout à fait classique, comparable aux courbes publiées par Cohn et Pappenheimer (51).

L'étude des surnageants par des titrages « in vivo » montre qu'il y a de la toxine libre après le maximum de précipitation, et dans le surnageant et dans le précipité; on trouve de l'antitoxine libre jusqu'au point L_+ . Entre 400 et 600 UF, les quantités de toxine libre sont très faibles ou nulle. Le point L_+ et le point L_f se trouvent à gauche du maximum.

Les tests de diffusion révèlent de la toxine libre tout de suite après le maximum de précipitation, tandis que pour 100 unités de toxine, on ne détecte plus d'antitoxine libre par précipitation spécifique en gélose.

Nous voyons que la courbe est comparable aux courbes obtenues avec des sérums de chevaux riches en anticorps γ -globulines; le rapport des anticorps flocculants et neutralisants est tel que les points L_+ et L_f tombent presque ensemble. Nous avons également fait l'étude quantitative avec une toxine marquée à l'iode radioactif.

Les courbes de radioactivité des précipités et des surnageants sont les mêmes que celles obtenues avec les γ -globulines de cheval, mais seulement 81 % de la radioactivité a été retrouvée dans le précipité. La toxine employée était la même que celle utilisée pour l'étude de sérums de chevaux. Le sérum antidiptérique de lapin étudié contient donc de nouveau des anticorps non précipitants.

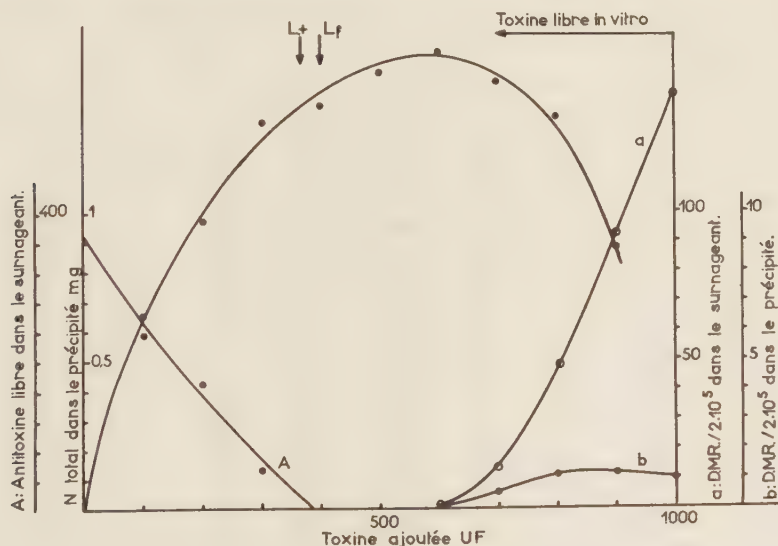


FIGURE 44. Sérum de lapin antidiptérique; Courbe 38.

18. ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DES ANTITOXINES

La détermination de A_m , la quantité maximum d'anticorps précipitable à partir d'un sérum, nous permet de calculer les valeurs suivantes: a) les microgrammes d'azote correspondant à une unité de floculation d'antitoxine: $A_m/400$; b) les microgrammes d'azote correspondant à une unité L_+ d'antitoxine: A_m/L_+ ; c) les unités de floculation par mg d'azote: $400/A_m$; d) les unités d'antitoxine (L_+) par mg d'azote: L_+/A_m .

Le tableau 21 montre les valeurs calculées à partir des courbes, des sérums à antitoxines β -2 prédominantes. Les écarts obtenus avec les 4 déterminations de 1451 sont faibles. Le sérum qui se rapproche le plus du 1451 (sérum qui contient la plus faible quantité de γ -antitoxines) est l'étalon de floculation de Copenhague qui a une activité spécifique de 654 unités/mg N.

L'étalon antitoxique donne un rapport de 572 UF/mg N.

Nous verrons plus loin que, bien que les valeurs UF/mg N soient une des caractéristiques des β -2 antitoxines (la valeur calculée pour le sérum 1451 en présence de phosphate 1,4 M se rapproche le plus de la valeur réelle), les valeurs L_+/mg N

TABLEAU 20. Sérums à antitoxines γ prédominantes

Sérum	Sai- gnée du (jour)	Cour- be n°	Fi- gure	L_+/L_f	A_m	$A_m/400$	$400/A_m$	A_m/L_+	L_+/A_m	Re- mar- ques
341	11	11	26	1,37	1 273	3,18	314	2,32	430	^a
341	11	11	26	1,37	1 293	3,23	309	2,36	423	^a
341	11	11	26	1,37	1 290	3,22	310	2,35	425	^a
1451	M	3	23	1,60	1 220	3,05	328	1,90	525	^a
441	17	6	24	2,90	1 760	4,40	227	1,52	659	^a
441	43	8	25	1,89	1 882	4,70	213	2,49	402	^a
441	43	8	25	1,89	1 890	4,72	212	2,50	400	^b
441	43	8	25	1,89	1 899	4,75	210	2,51	399	^c
441	43	8	25	1,89	1 870	4,67	214	2,47	404	^d
441- γ (1)		19	29	4,86	2 694	6,74	148	1,39	722	^a
441- γ (2)		20	29	2,50	1 728	4,32	231	1,73	578	^a
441- γ (3)		18	28	2,30	1 622	4,06	246	1,76	568	^a
L 5 D		38	44	0,92	1 342	3,36	298	3,64	274	^a
L 5 D		38	44	0,92	1 380	3,45	290	3,75	266	^b
L 5 D		38	44	0,92	1 374	3,44	291	3,74	268	^c
L 5 D		38	44	0,92	1 370	3,42	292	3,72	269	^d

^a. A_m calculé d'après les valeurs expérimentales de la courbe de précipitation quantitative.

^b. A_m calculé d'après la relation de Heidelberg (105).

^c. A_m calculé après correction pour la radioactivité à partir des valeurs expérimentales.

^d. A_m calculé après correction pour la radioactivité avec la relation de Heidelberg (105).

TABLEAU 21. Sérums à antitoxines β -2 prédominantes

Sérum	Sai- gnée du (jour)	Cour- be n°	Fi- gure	L_+/L_f	A_m	$A_m/400$	$400/A_m$	A_m/L_+	L_+/A_m	Re- mar- ques
1451	82	2	23	0,89	604	1,51	662	1,70	590	°
1451	82	2	23	0,89	604	1,51	662	1,70	590	°
1451- β -2		17	27	0,85	642	1,61	623	1,89	530	°
1451*		31	41	0,85	621	1,55	644	1,82	547	°
341	38	13	26	0,91	843	2,11	474	2,32	432	°
341	38	13	26	0,91	860	2,15	465	2,36	426	°
Cop. Floc.		15	27	1	612	1,53	654	1,53	654	°
Cop. Ant.		16	27	1	699	1,75	572	1,75	572	°
441- β 2		30	36	1,75	1460	3,65	274	2,09	479	°

* Courbe faite en tampon phosphate mono-dipotassique 1,4 M.

Remarques ° et ° : voir tableau 20.

TABLEAU 22. Sérums digérés

Sérum	Tam- pon	Cour- be n°	Fi- gure	L_+/L_f	A_m	$A_m/400$	$400/A_m$	A_m/L_+	L_+/A_m	Re- mar- ques
5353 AD	*	14	27	0,875	549	1,37	730	1,57	638	°
906	*	24	30	0,88	563	1,41	710	1,60	626	°
906	*	24	30	0,88	588	1,47	680	1,67	599	°
1451-D**	*	32	42	1	451	1,13	888	1,13	888	°
1451-D**	1 M K/K ₂	33	42	1	493	1,23	814	1,23	814	°
1451-D**	1,4 M K/K ₂	34	42	1	492	1,23	815	1,23	815	°
1451-D**	1 M K/K ₂	35	43	0,8	551	1,38	726	1,72	581	°
1451-D**	1 M K/K ₂	36	43	0,8	571	1,43	700	1,79	560	°
1451-D**	1 M K/K ₂	37	43	0,8	522	1,30	766	1,63	614	°

* Conditions habituelles (tampon borate).

** 1451-D : sérum digéré à partir du précipité spécifique.

Remarques ° et ° : voir tableau 20.

n'ont aucun rapport avec A_m et sont uniquement l'un des caractères de la préparation.

Après digestion de l'antitoxine, les valeurs UF/mg N et L_+/mg N deviennent plus élevées. Les enzymes coupent les antitoxines en fractions dont une partie seulement a une activité spécifique. Les rapports obtenus dépendent donc du degré de digestion et de l'ensemble des anticorps obtenus par digestion. Le tableau 22 donne les valeurs calculées pour les antitoxines digérées.

Les deux préparations obtenues à partir de la digestion du précipité spécifique du sérum 1451 donnent avec des toxines diverses des valeurs voisines, à condition que les courbes aient été faites en présence de phosphate 1 ou 1,4 M (courbes 33 et 34 d'une part, 35, 36 et 37 d'autre part. Notons également les valeurs comparables trouvées après digestion du sérum total (906 D et 5353 AD).

TABLEAU 23. Mélanges artificiels de β -2 et de γ -antitoxines

Sérum	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	A_m	$A_m/400$	$400/A_m$	A_m/L_+	L_+/A_m	Re- mar- ques
1451- β -2	17	27	0,85	642	1,60	623	1,89	530	^a
γ -10 %	21	29	1,13	850	2,13	471	1,88	532	^a
γ -30 %	22	29	1,38	1204	3,01	332	2,18	458	^a
γ -50 %	23	29	1,75	1446	3,62	276	2,07	484	^a
441- γ (2)	20	29	2,50	1728	4,32	231	1,73	578	^a

Remarque ^a : voir tableau 20.

TABLEAU 24. Sérums de chevaux sans immunité de base (à Schick positif)

Sérum	Sai- gnée du (jour)	Cour- be n°	Fi- gure	L_+/L_f	A_m	$A_m/400$	$400/A_m$	A_m/L_+	L_+/A_m	Re- mar- ques
854	25	25	31	0,38	892	2,23	449	5,87	171	^a
854	60	26	32	0,87	949	2,37	422	2,74	367	^a
825	39	27	33	0,32	681	1,70	588	5,31	188	^a
825	39	27	33	0,32	687	1,72	583	5,37	186	^b
825	39	27	33	0,32	741	1,85	541	5,78	173	^c
825	39	27	33	0,32	724	1,81	552	5,65	177	^d
825- γ		28	34	0,56	1307	3,27	306	5,83	171	^a
825- β -2		29	35	0,23	635	1,59	630	6,90	145	^a

Remarques ^a, ^b, ^c, ^d : voir tableau 20.

Si l'on compare les valeurs d'azote précipitable des sérums à γ -antitoxines avec les valeurs des sérums à β -2-antitoxines, on trouve dans le premier cas des valeurs d'azote correspondant à une unité de floculation beaucoup plus élevées, tandis que les valeurs par unité antitoxique sont plus proches (voir tableaux 20 et 21). Les valeurs obtenues chez des sérums à γ -antitoxines prédominantes diffèrent beaucoup d'un sérum à l'autre, puisque toutes les préparations contiennent des quantités diverses de β -2-antitoxines. Les préparations riches en γ -globulines obtenues par précipitation saline donnent des valeurs plus proches de celles des γ -antitoxines pures. Le tableau 23 montre les résultats obtenus pour des mélanges artificiels de γ et β -2-antitoxines.

Comme prévu, les valeurs L_+/A_m obtenues avec des sérums de chevaux sans immunité de base sont très basses, tandis que les valeurs de $400/A_m$ sont celles propres aux mélanges de β -2 et γ -antitoxines. Les valeurs obtenues pour les fractions β -2 et γ du sérum 825 diffèrent peu des valeurs obtenues pour les antitoxines de chevaux ayant une immunité de base (tableau 24).

19. VÉRIFICATION DE LA RELATION DE HEIDELBERGER ENTRE L'AZOTE TOTAL PRÉCIPITÉ ET L'AZOTE ANTIGÈNE AJOUTÉ

Il a été démontré par Cohn et Pappenheimer que la réaction entre la toxine diphtérique et plusieurs antisérums étudiés peut être décrite par les relations de Heidelberger et Kendall (105):

$$y = 2Rx - \frac{R^2}{A_m} x^2 \quad (12)$$

$$r = \frac{y}{x} = 2R - \frac{R^2}{A_m} x \quad (13)$$

dans lesquelles : $r = y/x$ = rapport azote anticorps/azote antigène du précipité spécifique; x = azote antigène dans le précipité; R = rapport y/x à l'équivalence; A_m = azote anticorps total précipitable.

Si l'on établit la courbe r en fonction de x , on obtient une droite dont l'ordonnée pour $x = 0$ égale $2R$ et la pente égale $-R^2/A_m$. A_m peut être calculé à partir de l'intersection de la droite avec l'abscisse (X_a) et l'ordonnée :

$$A_m = \frac{X_a R}{2} \quad (14)$$

Nous avons voulu vérifier si ces relations étaient aussi valables pour la précipitation quantitative des divers systèmes toxine-antitoxine que nous avons étudiés. Les formules (12) et (13) ne peuvent pas être utilisées dans le cas des sérums à β -2-antitoxine en raison de la solubilité du précipité dans la zone d'excès d'antitoxine.

Pour les sérums à γ -globuline prédominante, la première région de la courbe située en zone d'excès d'anticorps n'est pas vérifiée par cette relation. Par contre, pour les valeurs de x suffisamment élevées et pour certains sérums, on obtient

pour y/x en fonction de x , une zone rectiligne qui peut être extrapolée et qui permet le calcul des valeurs de R et A_m .

Le tableau 25 reproduit les valeurs de r calculées pour le sérum 441 (saignée du 43^e jour) à partir de la courbe 8, en considérant que le précipité contient la totalité de la toxine ajoutée et qu'il n'y a pas de précipitation de systèmes accessoires. Les valeurs en microgrammes de toxine ajoutée ont été calculées en prenant pour une toxine pure la valeur 3 100 UF/mg N. Le tableau 26 reproduit les mêmes résultats corrigés d'après les données obtenues avec la toxine radioactive (considérée comme étant 94 % pure). Nous présentons également dans ces tableaux la composition

TABLEAU 25

UF	Toxine ajoutée μg	N total précipité	Antitoxine précipitée	Antitoxine N/toxine N (r)	A/T
200	64	1000	936	14,6	6,58
300	97	1280	1183	12,2	5,50
400	129	1470	1341	10,4	4,69
500	161	1660	1499	9,31	4,18
600	193	1860	1667	8,67	3,90
700	226	2030	1804	7,98	3,59
756	243	2100	1857	7,57	3,44
800	258	2140	1882	7,29	3,28
890	287	2160	1873	6,52	2,94
900	290	2160	1870	6,46	2,90

TABLEAU 26

UF	Toxine précipitée % corrigé	Toxine précipitée μg corrigé	N total précipité	Antitoxine précipitée	Antitoxine N/toxine N (r)	A/T
200	80	51	1000	949	18,6	8,4
275	88	83,5	1260	1176	13,3	6
300	95	92	1280	1188	12,9	5,8
400	95	123	1470	1347	10,95	4,9
500	95	153	1660	1507	9,84	4,4
600	95	183	1860	1677	9,17	4,1
700	95	215	2030	1815	8,44	3,8
756	95	230	2100	1870	8,13	3,7
800	95	245	2140	1895	7,74	3,5
890	91	261	2160	1899	7,28	3,3
900	91	264	2160	1896	7,18	3,2

moléculaire des divers précipités; les poids moléculaires employés pour ces calculs sont de 72 000 pour la toxine et de 160 000 pour l'antitoxine native. Nous avons établi les courbes x/y en fonction de x (Fig. 45 et 46). Pour raison de commodité, nous portons les résultats obtenus avec les autres sérums dans deux séries de tableaux différents. On trouve les valeurs de A_m calculées pour les différents sérums étudiés dans les tableaux 20, 21, 22, 23, 24.

Nous portons dans les tableaux 27, 28, 29, 30 et 31, non pas les valeurs de R , mais la composition moléculaire A/T calculée *au maximum de la courbe* de précipitation quantitative, ainsi que les valeurs de la composition moléculaire des précipités pour les points L_+ et L_- . Le poids moléculaire employé pour l'antitoxine

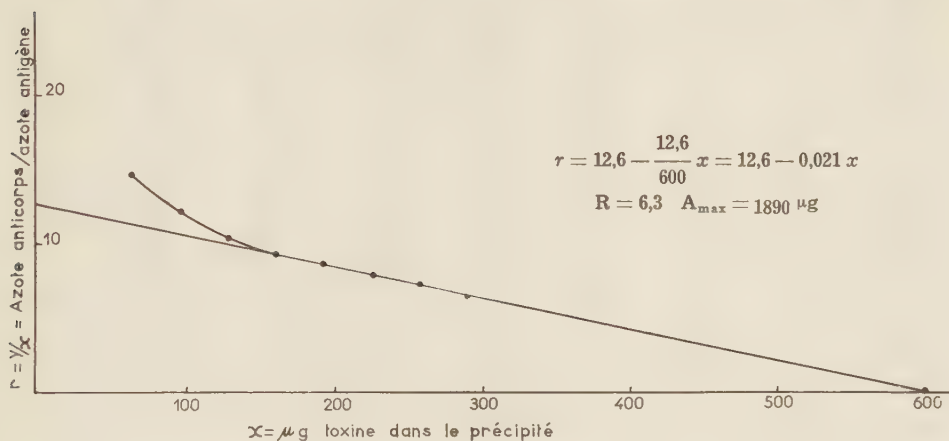


FIGURE 45. 441 saignée du 43^e jour non corrigé.

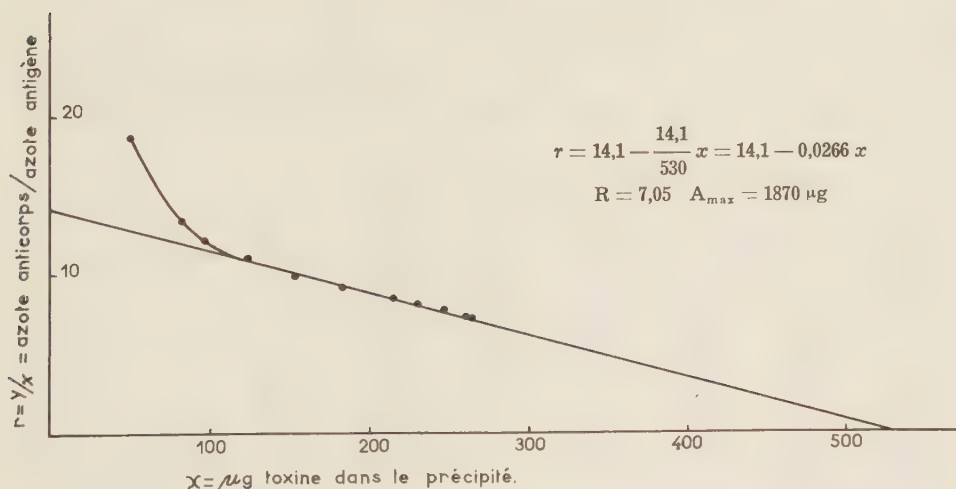


FIGURE 46. 441 saignée du 43^e jour corrigé pour la radioactivité.

TABLEAU 27. Sérums à antitoxines- γ prédominantes

Sérum	Sai- gnée du (jour)	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	Antitoxine/toxine *			Re- mar- ques
					L_f	L_+	Max.	
341	11	11	26	1,37	4,19	3,20	2,64	^a
341	11	11	26	1,37	4,60	3,60	2,95	^c
341	11	11	26	1,37	—	—	3,06	^d
1451	M	3	23	1,60	3,26	2,39	1,50	^a
441	17	6	24	2,90	4,84	2,11	2,04	^a
441	43	8	25	1,89	4,69	3,44	2,94	^a
441	43	8	25	1,89	—	—	2,84	^b
441	43	8	25	1,89	4,90	3,70	3,30	^c
441	43	8	25	1,89	—	—	3,17	^d
441- γ (1)		19	29	4,86	5,46	1,66	2,78	^a
441- γ (2)		20	20	2,50	4,50	2,41	2,00	^a
441- γ (3)		18	28	2,30	4,47	2,32	2,83	^a
L 5 D		38	44	0,92	4,41	4,68	3,15	^a
L 5 D		38	44	0,92	—	—	4,05	^b
L 5 D		38	44	0,92	5,20	5,50	3,80	^c
L 5 D		38	44	0,92	—	—	3,96	^d

* Antitoxine/toxine = A/T : composition moléculaire.

Remarques ^a, ^b, ^c, ^d : voir tableau 20.TABLEAU 28. Sérums à antitoxines β -2 prédominantes

Sérum	Sai- gnée (jour)	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	Antitoxine/toxine *			Re- mar- ques
					L_f	L_+	Max.	
1451	82	2	23	0,89	2,1	2,35	2,1	^a
1451	82	2	23	0,89	2,1	2,35	2,1 ^a	^c
1451- β -2		17	27	0,85	2,21	2,49	1,8	^a
1451**		31	41	0,85	2,17	2,25	1,73	^a
341	38	13	26	0,91	2,77	3,12	1,75	^a
341	38	13	26	0,91	3,08	3,45	1,93	^c
Cop. Floc.		15	27	1	2,09	2,09	1,43	^a
Cop. antit.		16	27	1	2,32	2,32	1,63	^a
441- β -2		30	36	1,75	3,84	2,76	2,19	^a

* Antitoxine/toxine : voir tableau 27.

** Courbe faite en tampon phosphate mono-dipotassique 1,4 M.

Remarques ^a, ^c : voir tableau 20.

digérée est de 90 000. Nous indiquons ces mêmes valeurs corrigées pour des sérums qui ont été étudiés avec une toxine radioactive. Nous voyons que même si les valeurs non corrigées sont en général proches de celles calculées après correction pour la radioactivité, les différences deviennent importantes pour les sérums conte-

TABLEAU 29. Sérums digérés

Sérum	Tam- pon	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	Antitoxine/toxine *			Re- mar- ques
					L_f	L_+	Max.	
5353-AD	**	14	27	0,875	3,35	3,88	2,29	"
906	**	24	30	0,88	3,35	3,73	2,14	"
906	**	24	30	0,88	3,97	4,43	2,57	"
1451-D***	**	32	42	1	2,80	2,80	2,22	"
1451-D***	1 M K/K ₂	33	42	1	3,04	3,04	2,04	"
1451-D***	1,4 M K/K ₂	34	42	1	3,04	3,04	2,04	"
1451-D***	1 M K/K ₂	35	43	0,8	3,42	4,24	2,73	"
1451-D***	1 M K/K ₂	36	43	0,8	3,54	4,40	2,37	"
1451-D***	1 M K/K ₂	37	43	0,8	3,22	4,05	2,87	"

* Antitoxine/toxine : voir tableau 27.

** Conditions habituelles (tampon borate).

*** 1451-D : sérum digéré à partir du précipité spécifique.

Remarques " et ° : voir tableau 20.

TABLEAU 30. Mélanges artificiels de β -2 et γ -antitoxines

Sérum	Courbe n°	Figure	L_+/L_f	Antitoxine/toxine *			Remar- ques
				L_f	L_+	Max.	
1451- β -2	17	27	0,85	2,21	2,49	1,80	"
γ -10 %	21	29	1,13	2,94	2,63	2,15	"
γ -30 %	22	29	1,38	3,59	2,84	2,40	"
γ -50 %	23	29	1,75	4,40	2,77	2,37	"
441- γ (2)	20	20	2,50	4,50	2,41	2,00	"

* Antitoxine/toxine : voir tableau 27.

Remarque " : voir tableau 20.

TABLEAU 31. Sérums de chevaux sans immunité de base (à Schick positif)

Sérum	Sai- gnée du (jour)	Courbe n°	Figure	L_{+}/L_f	Antitoxine/toxine *			Re- mar- ques
					L_f	L_{+}	Max.	
854	25	25	31	0,38	2,77	3,96	2,08	"
854	60	26	32	0,87	3,25	3,63	2,18	"
825	39	27	33	0,32	2,37	3,72	1,90	"
825	39	27	33	0,32	—	—	2,25	"
825	39	27	33	0,32	3,43	5,68	3,01	"
825	39	27	33	0,32	—	—	3,15	"
825- γ		28	34	0,56	3,94	4,99	2,26	"
825- β -2		29	35	0,23	2,13	0,30	1,77	"

* Antitoxine/toxine : voir tableau 27.

Remarques ^a, ^b, ^c, ^d : voir tableau 20.

nant des anticorps non précipitants en quantité élevée, tels que les antitoxines de chevaux sans immunité de base. L'étude des tableaux 27 à 31 nous permet d'observer une nouvelle caractéristique propre aux différents types d'antitoxines étudiées, celle de la composition moléculaire des précipités à l'optimum de floculation.

Pour les antitoxines à γ -globulines, la composition moléculaire antitoxine/toxine à l'optimum de floculation, est supérieure à 4; les β -2-globulines ont un rapport d'environ 2,2 (valeur de la fraction 1451- β -2 qui contient la plus faible quantité en γ -globulines). Les mélanges artificiels montrent des valeurs qui augmentent suivant les proportions en γ -globulines; cette augmentation n'est pas proportionnelle à la quantité de γ -globulines, mais plus élevée. La composition moléculaire des antitoxines digérées varie entre 3 et 4. La composition moléculaire au maximum de la courbe de précipitation quantitative, dépend des préparations d'antitoxines et montre, pour les 3 types d'antitoxines, des différences beaucoup moins significatives.

On peut se demander si la différence observée entre les β -2 et les γ -antitoxines ne peut pas avoir pour cause la technique de floculation employée. L'optimum de floculation de tous les sérums étudiés (à l'exception du sérum de lapin) a été déterminé par la technique de Ramon (technique β). Il est possible que les valeurs obtenues avec cette dernière technique si elles avaient été déterminées par la technique α (technique de Dean et Webb), auraient été différentes. Bowen a démontré que la divergence des résultats obtenus par l'emploi des deux techniques α et β , tenait à ce que dans l'exécution habituelle de chacune d'elles, la concentration totale (N antitoxine + N toxine) ne restait pas constante. Nous avons vérifié expérimentalement la technique de Bowen avec les γ antitoxines (γ -441) et les β -2 antitoxines (1451). Les optimum α et β coïncident. Les titres en unités de floculation ainsi déterminées sont égaux à ceux trouvés avec notre technique habituelle (Ramon).

20. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La réaction toxine-antitoxine diphtérique a été étudiée. L'hyperimmunisation donne des résultats très différents chez le cheval, selon qu'elle est pratiquée sur un animal sans immunité de base ou un animal présentant déjà une immunité de base. L'étude a été faite avec des sérums de ces deux groupes de chevaux. Les faits suivants ont été observés avec des antitoxines de chevaux avec une immunité de base.

L'antitoxine peut être localisée dans les γ -globulines, en général au début de l'hyperimmunisation, et dans les β -2 globulines, en général à la fin de l'hyperimmunisation.

Les sérums de chevaux à γ -antitoxine prédominante, provenant de chevaux à immunité de base, ont un rapport L_+/L_f supérieur à 1, compris généralement entre 1 et 2, tandis que les sérums à β -2 antitoxine prédominante, ont un rapport $L_+/L_f < 1$, mais voisin de ce chiffre, compris en général entre 0,85 et 1.

La forme de la courbe de précipitation quantitative dépend de la nature électrophorétique de l'antitoxine. La courbe de type flocculation est obtenue avec les sérums à β -2 antitoxine prédominante. Les sérums à γ -antitoxine prédominante donnent une courbe qui rappelle la courbe de type lapin. Les sérums contenant les deux types d'antitoxines donnent des courbes intermédiaires. Le point L_+ est, pour les sérums à β -2 antitoxine prédominante, situé à gauche (ou proche) du point L_f . Les surnageants des précipités obtenus pour les points situés tout au long de la zone rectiligne, contiennent de la toxine ou de l'antitoxine libre seulement en faible quantité. Les précipités correspondent aux mélanges situés à droite du point L_+ ne sont pas neutres, mais contiennent un excès de toxine non neutralisée. Pour les sérums à γ -antitoxine, le point L_+ est à droite du point L_f , dans la véritable zone d'équivalence où se trouve également le maximum de la courbe. Les précipités à droite du point L_+ contiennent de la toxine libre seulement en faible quantité. Les deux types d'antitoxines présentent donc des caractères très profondément différents.

Les antitoxines de sérums de chevaux sans immunité de base présentent des valeurs L_+/L_f très basses, voisines de 0,3. Les anticorps sont également de mobilité électrophorétique différente et associés aux γ et β -2 globulines. La courbe de précipitation quantitative dépend encore une fois de la mobilité électrophorétique des anticorps.

Les antitoxines β -2-globulines donnent de nouveau une courbe de type cheval, les γ -antitoxines une courbe de type lapin. Le point L_+ se trouve dans les deux cas à gauche du point L_f , dans la zone d'un grand excès d'anticorps. A partir de ce point, tous les précipités sont toxiques. La réaction toxine-antitoxine devient comparable à la réaction enzyme-antienzyme, où le précipité peut contenir la totalité de l'activité enzymatique. Les anticorps sont donc digérés contre des groupements spécifiques, situés sur la molécule de toxine, et peuvent être neutralisants ou non neutralisants. Nous avons envisagé de mettre en évidence cette multiplicité d'anticorps à l'aide d'une toxine digérée. Les résultats de ces expériences seront présentés dans le prochain chapitre.

La relation de Pappenheimer, azote total précipité = azote antitoxine + azote

toxine ($z = y + x = A + T$) ne s'applique pas aux sérums non purifiés que nous avons étudiés; les valeurs calculées à l'aide de la pente de la zone rectiligne sont inférieures à la valeur d'une toxine pure, mais le principe reste néanmoins valable. Il a été démontré qu'il existe au début de la zone rectiligne des complexes antigènes-anticorps solubles. Ces complexes sont également précipités pour des quantités plus élevées de toxine. La présence d'antitoxines γ -globulines, même en faible quantité dans toutes les préparations de sérums non purifiés, est une des raisons qui expliquent qu'au début de la zone rectiligne, tout l'anticorps ne soit pas précipité.

La courbe de précipitation quantitative a été étudiée avec des sérums digérés. Ceux-ci peuvent être préparés par deux voies différentes. La première est la digestion protéolytique du sérum total suivie de coagulation sélective d'une partie des protéines. Les courbes de précipitation quantitative faites avec ces sérums, en général des mélanges de sérums de plusieurs chevaux hyperimmunisés pendant une très longue période, sont du type floculation. La pente de la zone rectiligne ne correspond pas à celle d'une toxine pure. La digestion du précipité spécifique obtenu avec des sérums contenant peu d'anticorps accessoires et de type β -2 globulines, nous a fourni des préparations contenant uniquement des anticorps antitoxiques. Les courbes de précipitation quantitative faites avec ces dernières préparations ont justifié la théorie de Pappenheimer. Si les courbes sont faites en milieu salin concentré, on obtient une zone rectiligne dont la pente correspond à peu près à celle d'une toxine pure.

L'influence d'anticorps accessoires sur les courbes de précipitation quantitative a été démontrée. Les sérums de chevaux hyperimmunisés avec une toxine purifiée contiennent peu d'anticorps accessoires, leur influence sur la courbe de précipitation quantitative est faible, même si les courbes sont faites avec une toxine non purifiée. Au contraire, les sérums contenant des anticorps accessoires en quantité élevée, donnent des résultats tout à fait différents, si la courbe est faite avec une toxine pure ou avec une toxine brute. Dans ce dernier cas, il y a co-précipitation des systèmes antigène-anticorps autres que le système toxine-antitoxine; la quantité d'azote spécifiquement précipitable devient plus élevée.

La valeur L_+/L_f dépend aussi, en plus de la proportion relative γ -antitoxine/ β -2 antitoxine, de la présence d'antitoxine non précipitante. Il est évident que plus un sérum contient d'antitoxine non précipitante, plus son rapport L_+/L_f est élevé. La quantité d'anticorps non précipitants dans un sérum peut être augmentée artificiellement par le fractionnement par des sels neutres; on sait aussi que par vieillissement, les sérums peuvent prendre leur pouvoir floculant, tout en conservant leur pouvoir neutralisant. La présence d'anticorps non précipitants peut être facilement vérifiée avec une toxine pure marquée avec un élément radioactif artificiel.

Le marquage de la toxine a été fait à l' ^{131}I . Les quantités d'iode à fixer sur la toxine peuvent être facilement dépassées. La toxine se transforme d'abord en dérivé atoxique et perd ensuite, par une ioduration plus élevée, son pouvoir floculant. La technique de marquage décrite permet d'obtenir une toxine radioactive, tout en lui conservant sa toxicité *in vivo* et son pouvoir floculant. La toxine radioactive a permis d'évaluer les anticorps non précipitants. Les sérums de chevaux ayant un rapport L_+/L_f supérieur à 0,8 contiennent peu d'anticorps non précipitants, tandis que leur quantité est élevée pour des sérums de chevaux sans immu-

nité de base. La même technique de marquage peut être appliquée à l'obtention d'antitoxines radioactives.

L'étude des courbes de précipitation quantitative a permis de vérifier la théorie de Pappenheimer. Il a été démontré qu'au début de la zone rectiligne, la quantité d'anticorps précipités est inférieure à la quantité précipitée à la fin de la zone rectiligne; la différence est néanmoins faible. Il a été vérifié que la relation de Heidelberger était aussi valable pour la réaction toxine-antitoxine γ -globuline. La relation ne s'applique pas à la première partie de la courbe correspondant à un grand excès d'anticorps. Par contre, pour des valeurs de toxine suffisamment élevées, on obtient pour y/x en fonction de x , une zone rectiligne qui permet de calculer R et A_m . Les valeurs déterminées après correction pour les anticorps non précipitants sont proches des valeurs expérimentales. La composition moléculaire antitoxine/toxine (A/T) est à l'optimum de floculation, supérieure à 4 pour les antitoxines à γ -globulines; les β -2 globulines ont un rapport d'environ 2,2. Ce rapport varie entre 3 et 4 pour les sérums digérés étudiés. Le rapport A/T élevé des γ -antitoxines a donc également pour cause le rapport L_+/L_f élevé, observé avec ces anticorps. Le point L_f n'est pas en relation avec la vraie zone de neutralisation, mais se situe en pleine zone d'excès d'anticorps. Nous avons déjà vu que le rapport L_+/L_f dépend également de la présence d'anticorps non précipitants et du fait que les antitoxines sont des mélanges d'anticorps dirigés contre les groupes antigènes déterminants, situés sur la molécule de toxine.

Étude sur les groupements spécifiques dans le motif antigénique de la toxine diphtérique et leurs anticorps correspondants

1. INTRODUCTION

L'hétérogénéité des anticorps dirigés contre un antigène a été démontrée à plusieurs reprises. Déjà Ehrlich émit l'hypothèse que les anticorps seraient dirigés contre certains groupes caractéristiques de l'antigène et que la combinaison se ferait par interaction. La réalité de cette conception a été démontrée par des travaux sur des antigènes de synthèse ainsi que par des études sur les réactions croisées.

Il a été généralement admis que les antigènes sont porteurs de groupes déterminants multiples auxquels correspondent les divers anticorps. Ces anticorps, bien qu'étant tous les mêmes, seraient plus ou moins bien adaptés au motif antigénique et présenteraient une multiplicité variant autour d'une moyenne.

L'identification et le dénombrement des divers groupes déterminants situés sur la molécule d'un antigène naturel résulte de travaux récents. Il a été démontré par Lapresle (135, 136, 137, 138, 139) que les anticorps sont des mélanges de spécificité complètement différente dirigés contre les divers groupements déterminants de l'antigène. Ces études ont été faites sur l'albumine humaine dégradée par un extrait de rate de lapin.

La dégradation à $\text{pH} = 3$ et à 37° se fait par la rupture d'un petit nombre de liaisons peptidiques formant des produits intermédiaires qui réagissent spécifiquement avec le sérum anti-albumine. La sérum-albumine comporte trois groupements spécifiques différents qui peuvent être mis en évidence par la technique de diffusion en gélose et par l'immuno-électrophorèse. Chacun de ces trois groupements précipite indépendamment son anticorps spécifique présent dans le sérum anti-albumine de lapin. Les groupements spécifiques sont, à la suite d'une dégradation

prolongée, transformés en antigènes non-précipitants. Les trois anticorps précipitants se forment indépendamment l'un de l'autre au cours de l'immunisation anti-albumine; leur spécificité immunologique est la même, mais leurs proportions peuvent varier. La digestion en sac de cellophane de la sérum-albumine bovine par la chymotrypsine a été étudiée par Porter, qui a pu mettre en évidence une fraction dialysable, ayant le pouvoir d'inhiber la réaction albumine bovine - sérum anti-albumine bovine (234).

Pope (233) a étudié la dégradation enzymatique de la toxine diphtérique. La toxine a été digérée par la trypsine à $\text{pH} = 8$ et à 20°C ; des prélèvements ont été faits à des temps variables, et testés après que l'on eût arrêté la digestion par l'inhibiteur de la trypsine. Les valeurs « *in vivo* » et « *in vitro* » de la toxine ont été déterminées, ainsi que le nombre de lignes de précipitation par diffusion en gélose. Il résulte de cette étude qu'on peut observer deux zones de floculation pendant la digestion. La toxicité de la préparation est rapidement détruite par la trypsine et ne semble pas être due à la formation d'une anatoxine. La toxine qui, avant la digestion, ne donnait qu'une ligne par la technique de diffusion, en présente jusqu'à quatre pendant la digestion. Une partie de la molécule de la toxine résiste à la dégradation enzymatique. Pope considère que « l'enveloppe floculante » du système toxine-antitoxine diphtériques est celle d'un système complexe de plusieurs antigènes et de leurs anticorps. Sans pouvoir préciser duquel des antigènes résulte le pouvoir lethal et dermonécrotique de la toxine, l'auteur propose l'isolement de ces antigènes purs à partir de la toxine cristallisée.

2. PLAN DE TRAVAIL

Nous avons voulu examiner les divers sérums antidiphtériques déjà étudiés vis-à-vis de préparations de la toxine digérée, afin de déterminer le nombre de motifs antigéniques différents situés sur la molécule de toxine et de trouver par cette voie une explication des différences entre les valeurs « *in vivo* » et « *in vitro* » des diverses antitoxines. La toxine a été digérée par la trypsine cristallisée à 37° et à $\text{pH} = 7,61$ en tampon phosphate de potassium $0,15\text{ M}$ + $\text{NaCl } 0,172\text{ M}$. La trypsine employée (préparation commerciale de la firme Bios) avait une activité de $0,833.10^{-3}$ (T.U.)^{cas.} par μg . On a déterminé la quantité d'inhibiteur de trypsine (préparé à partir du blanc d'œuf selon la technique de Lineweaver et Murray) (144) à ajouter aux échantillons pour arrêter la digestion après un temps déterminé. La toxine a été digérée par des concentrations différentes de trypsine et nous avons déterminé, par rapport au temps de digestion, l'activité « *in vitro* » de la toxine par la réaction de floculation et l'activité « *in vivo* » par la détermination du nombre de doses minima réactives (réaction intradermique sur lapin). L'existence des divers motifs antigéniques présents dans la toxine digérée a été recherchée par la technique de diffusion en gélose, faite dans la plupart des cas, à l'optimum de floculation. La mobilité électrophorétique a été étudiée par la technique d'immuno-électrophorèse. Le motif floculant de la toxine a été dépisté par précipitation avec un sérum floculant de faible pouvoir antitoxique. Le surnageant de cette expérience a été utilisé pour étudier le pouvoir neutralisant d'autres sérums. La réaction de précipitation quantitative a été étudiée avec des préparations de toxine digérée.

3. LA DIGESTION DE LA TOXINE PAR RAPPORT AU FACTEUR TEMPS ET PAR RAPPORT A LA CONCENTRATION DE L'ENZYME

La digestion de la toxine diphtérique a été étudiée en fonction du temps avec des concentrations variables de trypsine. Nous avons observé, par la technique de diffusion en gélose, la formation de plusieurs lignes de précipitation spécifique. Ces lignes rejoignent toutes la ligne unique de la réaction « toxine-antitoxine » du système témoin. Les lignes formées disparaissent au cours de la digestion, leur persistance dépend de la concentration de trypsine. Avec de faibles concentrations, elles sont visibles après 24 heures de digestion, tandis qu'avec des concentrations plus élevées, elles disparaissent au bout de quelques heures. Nous n'avons pas pu mettre en évidence, avec nos sérums, des fractions trypsino-résistantes. Les expériences ont été faites dans les conditions suivantes : A 9 ml de toxine titrant 400 UF/ml, nous avons ajouté 1 ml d'une solution de trypsine cristallisée à 2 mg/ml. Des prélèvements ont été faits au bout de temps variables et à chaque prélèvement de 2 ml, on a ajouté 0,2 ml de la solution d'inhibiteur à 5 mg/ml.

La figure 47 montre les résultats de la diffusion en gélose des prélèvements de cette expérience (désignée ultérieurement comme expérience 1) testés avec 4 sérums différents :

Sérum	Saignée du (jour)	L_+/L_f
341	38	0,91
1451	82	0,89
441	43	1,89
825	39	0,32

La même expérience a également été faite à d'autres concentrations de trypsine.

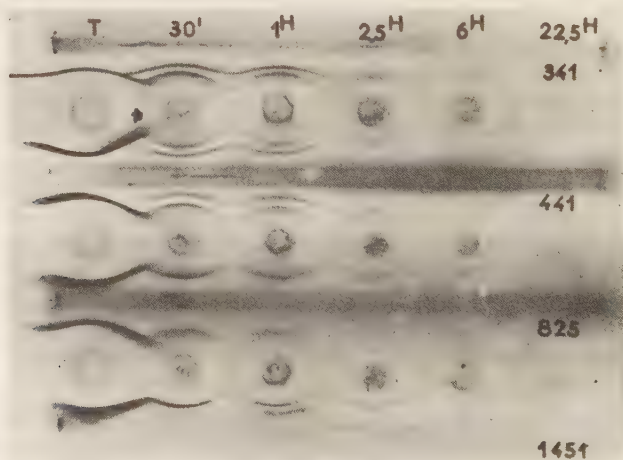


FIGURE 47. Digestion de la toxine diphtérique. Concentration en trypsine 200 μ g/ml. Prélèvements à temps variables testés contre les sérums 341, 441, 825 et 1451, par la technique de double diffusion sur plaque.

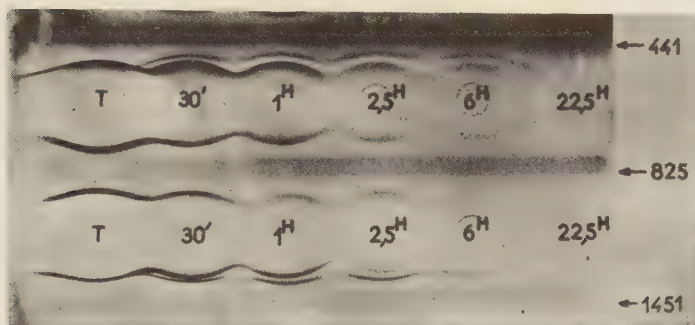


FIGURE 48. Digestion de la toxine diphtérique. Concentration en trypsine 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Prélèvements à temps variables testés contre les sérums 441, 825 et 1451, par la technique de double diffusion sur plaque.

La figure 48 montre les résultats obtenus en employant 5 fois moins de trypsine; concentration finale en trypsine : 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (expérience 2). Nous voyons que les sérums 341, 1451 et 441 donnent déjà après 30 minutes de digestion, 2 lignes très nettes qui rejoignent la ligne de la toxine témoin (T). Outre ces deux lignes, nous avons également pu dépister une autre ligne très faible, visible seulement pour des concentrations élevées en toxine digérée. Le sérum 825 donne, durant toute la digestion, une ligne nette; une deuxième ligne, mais faible, a été observée dans certains cas. Nous voyons que les deux lignes caractéristiques du premier groupe de sérums, ainsi que celle formée avec le sérum 825, persistent pendant plus de temps dans les conditions de l'expérience 2; néanmoins, elles deviennent plus fai-

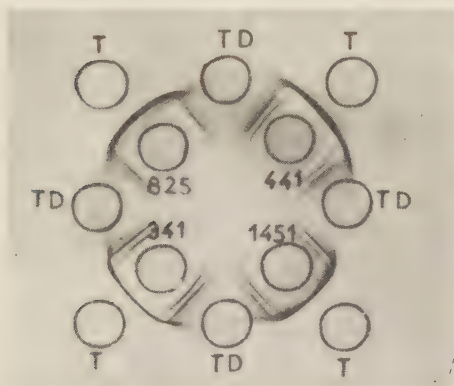


FIGURE 49. Mise en évidence de l'hétérogénéité des anticorps antidiphtériques par une toxine digérée. T : toxine non digérée (témoin). T.D. : toxine digérée pendant 30 minutes par la trypsine cristallisée, concentration : 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sérums étudiés n° 441, 341, 1451 et 825. Technique de double diffusion sur plaque.

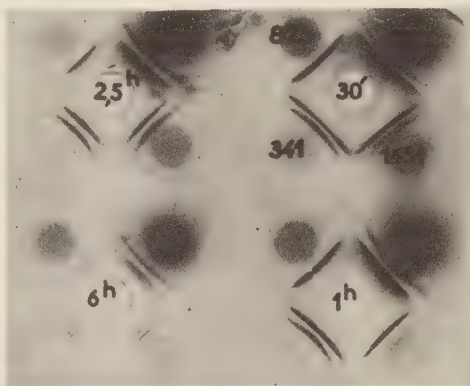


FIGURE 50. Mise en évidence de l'hétérogénéité des anticorps antidiphtériques par une toxine digérée pendant des temps variables (30 minutes, 1 heure, 2 heures 30 et 6 heures). Sérums étudiés n° 441, 341, 1451 et 825. Technique de double diffusion sur plaque.

bles au cours de la digestion de la toxine pour disparaître après un temps déterminé. La figure 49 montre encore une fois les lignes formées par la toxine testée contre les 4 sérums différents, après 30 minutes de digestion dans les conditions de l'expérience 1 (T.D.) avec, comme témoin, la toxine non digérée T. La figure 50 montre, pour des temps variables de digestion dans les conditions de l'expérience 2, le nombre de lignes de la toxine digérée (T.D.), testée également contre les 4 sérums différents. Il est facile d'identifier dans les autres sérums la ligne du sérum 825. Si nous comparons la figure 49 au schéma représenté dans la figure 6, nous voyons qu'elle correspond à l'exemple F; les expériences d'épuisement (cf. plus loin) montreront que les doubles lignes ne correspondent pas à un mélange d'antigènes AB + B, mais à un mélange A + B. Nous voyons également un prolongement de la ligne de la toxine témoin (comparer la fig. 49 à la fig. 6, exemple C), indiquant que les sérums contiennent des anticorps dont on ne retrouve pas les motifs antigéniques correspondants dans les préparations de toxines digérées. Nous pensons qu'il sera possible de mettre en évidence ces motifs antigéniques par la digestion de la toxine avec d'autres enzymes.

4. LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DE LA TOXINE

La mobilité électrophorétique des produits de dégradation a été déterminée par la technique de l'immuno-électrophorèse. La détection a été faite par le sérum 341 qui donne deux lignes de précipitation spécifique et le sérum 825 qui en donne une seule. La figure 51 montre les résultats de l'électrophorèse de la toxine digérée pendant 1 heure dans les conditions de l'expérience 2. Nous voyons que la ligne formée avec le sérum 825 a une mobilité légèrement supérieure à celle de la toxine non digérée, cette dernière ayant, comme nous l'avons déjà vu (chapitre IV), une mobilité voisine de celle des globulines α . D'autre part, la deuxième ligne décelée

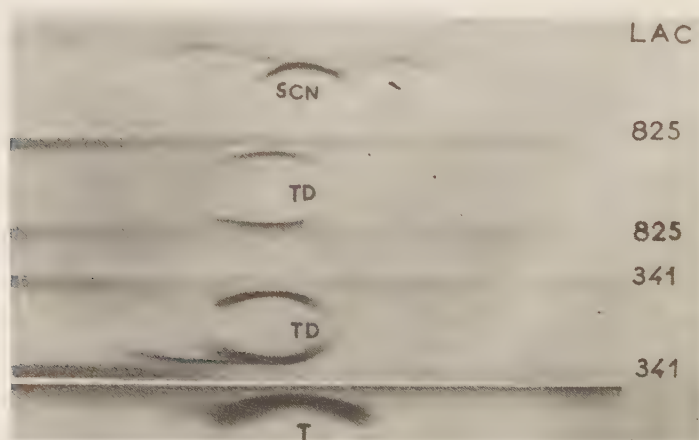


FIGURE 51. Mobilité électrophorétique des produits de dégradation de la toxine diphtérique déterminée par la technique d'immuno-électrophorèse.

par le sérum 341 semble être due à un groupe de produits portant le même motif antigénique, mais de mobilité variable. Ces mobilités sont comprises entre celles des α -globulines pour les plus lentes et celles des albumines pour les plus rapides.

5. TITRAGES COMPARÉS *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE LA TOXINE DIGÉRÉE

Le tableau 32 montre les résultats des titrages *in vivo* et *in vitro* des échantillons prélevés au cours de la digestion. Nous voyons que la toxicité de la préparation disparaît très rapidement, tandis que le pouvoir floculant diminue beaucoup moins vite. Le temps de floculation augmente dès le début de la digestion. Il est, pour les préparations marquées *a*, supérieur à 5 h; le floculat est, dans ce cas, très fin et l'optimum de floculation difficilement détectable.

TABLEAU 32. Digestion de la toxine dans les conditions de l'expérience 1

Fraction	Temps de digestion	UF/ml	K_f	DMR/ml	Pour- centage en UF	Pour- centage en DMR	DMR/UF
1	Témoin	400	< 1'	$7,08.10^7$	100 %	100 %	177.000
2	30'	150	24'	$1,40.10^6$	45,9 %	2,41 %	$9,34.10^3$
3	1 h	100	2 h 10'	10^6	30 %	1,73 %	10^4
4	2 h 30'	^a		$1,40.10^5$		0,241 %	
5	6 h	^a		< $1,40.10^5$		< 0,241 %	
6	22 h 30'	ne flocule pas		< $1,40.10^5$		< 0,241 %	

^a. Peu de floculat très fin, $K_f > 5$ heures. Pas d'optimum net de floculation.

Le tableau 33 montre les résultats de la digestion dans les conditions de l'expérience 2, c'est-à-dire à une concentration de 40 μ g de trypsine cristallisée par ml de solution de toxine. Nous voyons que, comparé à la première expérience, le pouvoir floculant et la toxicité baissent plus lentement.

TABLEAU 33. Digestion de la toxine dans les conditions de l'expérience 2.

Fraction	UF/ml	Temps de digestion	K_f	Pour- centage	DMR/ml	Pour- centage	DMR/UF	DMR/ 177.000
1	400	Témoin	< 1'	100 %	$7,08.10^7$	100 %	177.000	400
2	250	30 ¹	9'	76,4 %	$1,30.10^7$	22,4 %	52.000	73,5
3	225	1 h	18'	69,8 %	$5,00.10^6$	8,6 %	22.000	28,2
4	100	2,5 h	1 h 40'	29,7 %	$2,90.10^6$	5,0 %	29.000	16,4
5	^a	6 h			$5,00.10^5$	0,86 %		2,83
6	^a	24 h			< $1,00.10^5$	< 0,17 %		< 0,565

^a. Peu de floculat très fin, $K_f > 5$ heures. Pas d'optimum net de floculation.

6. DÉTERMINATION DES CARACTÈRES IMMUNOLOGIQUES DES PRODUITS DE DÉGRADATION

Nous avons voulu vérifier avec des préparations de toxine digérée si les pouvoirs floculant et neutralisant d'un sérum sont déterminés par les mêmes anticorps. Nous avons vu qu'il y a, dès le début de la digestion, formation de deux lignes de précipitation spécifique avec les sérums ayant des valeurs antitoxiques élevées, tandis que le sérum 825, avec un faible pouvoir antitoxique, donne seulement une ligne. Nous avons cherché à associer le pouvoir floculant et le pouvoir neutralisant à ces lignes de précipitation spécifique.

Les expériences ont été faites avec, d'une part, le sérum 825 et, d'autre part, le sérum 906. Ce dernier est un mélange de sérums de chevaux hyperimmunisés pendant une très longue période avec de l'anatoxine diphtérique, il contient donc le plus grand nombre d'anticorps possible. On a d'abord vérifié que la toxine digérée peut neutraliser les anticorps antitoxiques. Une préparation de toxine digérée pendant 30 minutes dans les conditions de l'expérience 1, titrait 150 UF/ml, $K_1:54'$, $1,3 \cdot 10^6$ D.M.R./ml. A 5 ml de toxine digérée ont été ajoutés : 0,44 ml de sérum, 906 à 1 700 unités de floculation et 1 500 U.A. par ml. Après centrifugation du précipité formé à 45° , on titre le surnageant afin de déterminer le nombre d'unités antitoxiques non neutralisées. Il reste moins de 5 unités par ml. La toxine digérée, mélangée à l'optimum de floculation au sérum 906, neutralise donc plus de 96 % des anticorps antitoxiques. La préparation de toxine digérée a perdu 97,5 % de sa toxicité, mais continue à réagir avec l'antitoxine. La toxine digérée T.D. et la préparation épuisée 906 E sont testées par la technique de diffusion sur plaque contre le sérum 906 avec comme témoin, la toxine non digérée T.

La figure 52 montre que la toxine non digérée donne avec le sérum 906 une ligne de précipitation, la toxine digérée deux lignes, un prolongement de la ligne T-906 montre de nouveau que le 906 contient des anticorps qui ne sont pas présents dans T.D. La préparation 906 E ne réagit plus avec le 906; d'autre part, elle ne réagit plus avec la toxine brute.

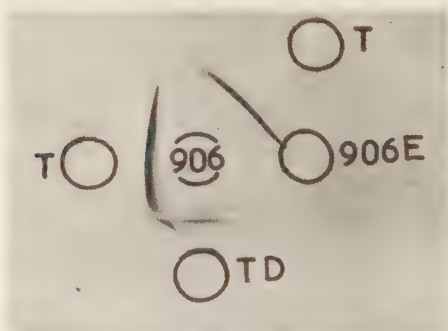


FIGURE 52. Epuisement du sérum 906 par la toxine diphtérique digérée. T : toxine non digérée (témoin). T.D. : toxine digérée. 906 E : sérum 906 épuisé par la toxine digérée.

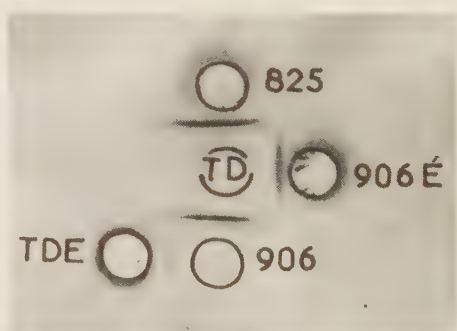


FIGURE 53. Caractérisation des anticorps antitoxine diphtérique présents dans les sérums 825 et 906 à l'aide de la toxine digérée par la technique de double diffusion sur plaque.

Une autre série d'expériences a été faite en épuisant d'abord la toxine digérée avec le sérum 825 et ensuite avec le sérum 906. La figure 53 montre les résultats de cette expérience. La toxine digérée a été préparée dans les conditions de l'expérience 2 (digestion d'une heure), concentration 200 UF/ml, K_f : 18'. Nous voyons qu'elle donne une ligne de précipitation avec le sérum 825 et deux lignes avec le sérum 906. T.D.E., la toxine digérée, épuisée par le sérum 825 à l'optimum de floculation, donne avec le sérum 906, une ligne de précipitation; cette ligne rejoint une des lignes du système TD-906. La préparation T.D.E. réagit avec le sérum 906 et donne naissance à un flocculat très fin. 906 E': le sérum 906 épuisé par T.D.E. à l'optimum de précipitation, réagit de nouveau avec T.D. Nous voyons donc que les deux lignes correspondent à deux systèmes de réaction antigène-anticorps différents. Les lignes 825-TD, TD-906 E' et une des lignes TD-906 se joignent; l'autre ligne du système TD-906 est identique à celle formée par le système T.D.E.-906. Le sérum 906 contient donc deux anticorps dont l'un est identique à l'anticorps présent dans le sérum 825 et la toxine digérée contient deux fractions antigéniques différentes.

Le sérum 825 contient peu d'anticorps antitoxiques et nous avons vérifié que T.D.E. est capable de neutraliser les anticorps antitoxiques présents dans le 906. A une solution de sérum 906 contenant 100 U.A./ml, nous avons ajouté des quantités croissantes de T.D.E. Les tubes restent 18 heures à 45° et on détermine ensuite, après centrifugation, par titrage *in vivo*, le nombre d'unités antitoxiques du surnageant. Le nombre d'unités antitoxiques retrouvées diminue progressivement avec la quantité de T.D.E. ajoutée. La neutralisation du sérum 906 par T.D. et par T.D.E. sera présentée dans l'étude quantitative de leurs réactions.

Les faits suivants résultent d'une deuxième expérience: T.D.: toxine digérée obtenue après une heure de digestion à 37°, concentration de trypsine cristallisée 40 µg/ml. Caractères de T.D.: 175 UF/ml, K_f : 25' (avec le sérum 906), 5,8.10⁶ DMR/ml. 2 ml T.D. + 0,206 ml 906 (optimum de floculation), surnageant après centrifugation = E1.

E1: 58 DMR/ml; < 10 U.A./ml (L_+) = < 7 %.

4 ml T.D. + 1,05 sérum 825 (39° jour) (optimum de floculation). Surnageant après centrifugation: E2.

E2: 5.10⁶ DMR/ml.

Sérum 906 dilué au 1/15 = 100 UA/ml. a: 1 ml 906 + 2 ml E2; b: 1 ml 906 + 1 ml E2 + 1 ml tampon; c: 1 ml 906 + 2 ml tampon. Surnageant a après précipitation = E3.

Résultats des titrages *in vivo* des surnageants: a: < 5 U.A./ml (L_+); b: environ 7,5 U.A./ml (L_+); c: 33 U.A./ml (L_+).

La figure 54 montre les résultats de la diffusion sur plaque dans les conditions suivantes:

Sérum 825 à 100 UF/ml	0,2 ml
Sérum 906 à 100 UF/ml	0,2 ml
E1	0,1 ml
E2	0,2 ml
E3	0,2 ml.

Les résultats de cette expérience montrent donc de nouveau que le sérum 906 et la toxine digérée donnent deux lignes de T.D. (une troisième ligne, mais très faible,

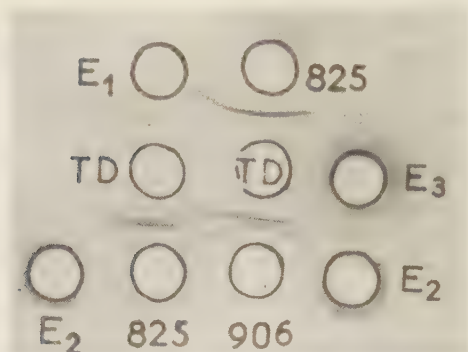


FIGURE 54. Caractérisation des anticorps antitoxine diphtérique présents dans les sérums 825 et 906 à l'aide de la toxine digérée par la technique de double diffusion sur plaque.

est également visible). Après précipitation par le sérum 906 (E1), ces lignes disparaissent. Après précipitation avec le sérum 825, le système E2-825 ne donne plus de précipitation spécifique, tandis que le système 906-E2 ne donne qu'une ligne. E3 donne avec T.D. une ligne identique à la ligne du système T.D.-825 (faiblement visible, à cause de la concentration réduite). L'expérience montre également que le système floculant du sérum 825 et de la toxine digérée n'est pas le système neutralisant et inversement, que le système neutralisant de 906-T.D. n'est pas le système floculant. La précipitation E2-906 demande plus de 5 heures, tandis que T.D.-906 flocule en 25 minutes.

Nous ne pouvons pas affirmer que le système neutralisant est celui qui donne la ligne du système E2-906; il est quand même probable qu'il en soit ainsi.

7. DÉVELOPPEMENT DES ANTICORPS AU COURS DE L'HYPERIMMUNISATION

L'hyperimmunisation des chevaux sans immunité de base a donné des sérums qui, pendant la première période de l'hyperimmunisation, avaient peu d'anticorps neutralisants. Une de ces saignées, celle du cheval 825 (saignée du 39^e jour) a déjà été étudiée en détail. Nous avons voulu vérifier nos résultats avec des saignées faites après l'immunisation prolongée de l'animal jusqu'au stade où les sérums présentent des rapports *in vivo/in vitro* > 0,5. L'étude a été faite avec les saignées suivantes :

Sérum	Saignée du (jour)	L_{+}/L_{f}
825	39	0,32
825	60	0,675
825	95	0,75

Les résultats de la diffusion sur plaque ont démontré que si, au début de l'hyperimmunisation, alors que les valeurs *in vivo/in vitro* sont très basses, il n'y a qu'une seule ligne de précipitation spécifique (que nous avons identifiée comme étant celle du système floculant), la deuxième ligne (que nous avons vu être en rapport avec le système neutralisant) apparaît quand l'hyperimmunisation progresse.

Les sérums ayant un rapport *in vivo/in vitro* bas contiennent en général même en faible quantité, des anticorps neutralisants. Il a été également, possible de mettre en évidence dans ces sérums d'autres anticorps précipitants en augmentant dans les tests de diffusion, la quantité d'antisérum par rapport à la quantité de toxine digérée. Si l'on prend, dans le cas du sérum 825, la quantité d'antisérum égale à 4 fois la quantité nécessaire pour obtenir l'équivalence de floculation, une deuxième ligne devient visible.

8. ÉTUDE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE AVEC DES TOXINES DIGÉRÉES

La toxine a été digérée dans les conditions de l'expérience 2 et le nombre des unités floculantes des préparations, déterminé. Suivant les conditions habituelles de l'étude quantitative, nous avons ajouté à 400 unités de floculation d'antitoxine, des doses croissantes de T.D. Les courbes de précipitation quantitative représentent l'azote total du précipité par rapport aux unités de floculation de T.D. Nous avons étudié la précipitation quantitative avec 4 sérums différents :

Sérum	Saignée du (jour)	L_+/L_f
825	39	0,32
441	43	1,89
1451	82	0,89
906		0,88

Les caractères de ces sérums ont déjà été présentés; nous rappelons que le sérum 825 est une saignée effectuée chez un cheval sans immunité de base, le sérum 441 est du type γ -globulines, le sérum 1451 du type β -2-globulines et le sérum 906, un sérum commercial digéré. La présence d'anticorps et d'antigènes libres dans les surnageants de précipitation quantitative a été recherchée avec la toxine digérée ainsi qu'avec les sérums employés par la technique de diffusion en gélose. On a déterminé parmi les systèmes détectés lequel correspond à celui du sérum 825-T.D.; dans la représentation graphique, ce système sera indiqué comme système « floculant ». La présence d'anticorps dans les surnageants a également été déterminée par des titrages *in vivo*. Les résultats sont représentés sur les figures 55, 56, 57 et 58.

Nous voyons que les courbes de précipitation faites avec les sérums 906 et 1451 diffèrent peu des courbes faites avec la toxine non digérée, tandis que les courbes faites avec les sérums 825 et 441 sont tout à fait différentes. Par contre, l'étude des surnageants montre que les différents systèmes antigène-anticorps réagissent indépendamment les uns des autres. Nous avons également étudié la courbe de

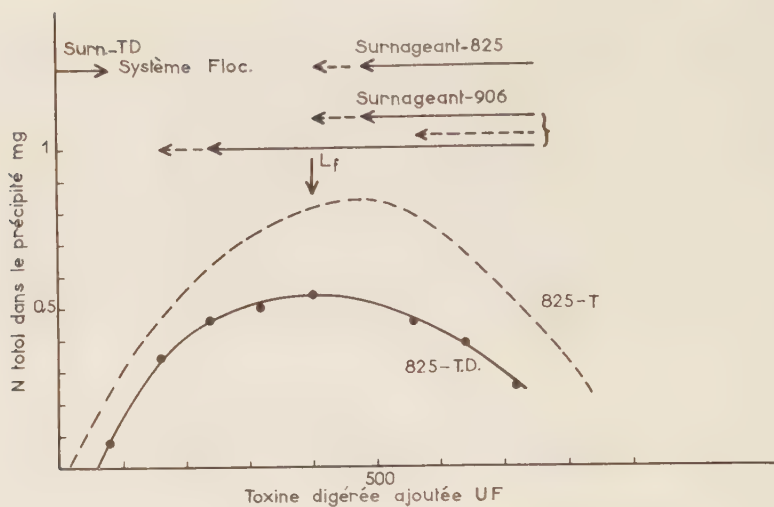


FIGURE 55. Courbe 39.

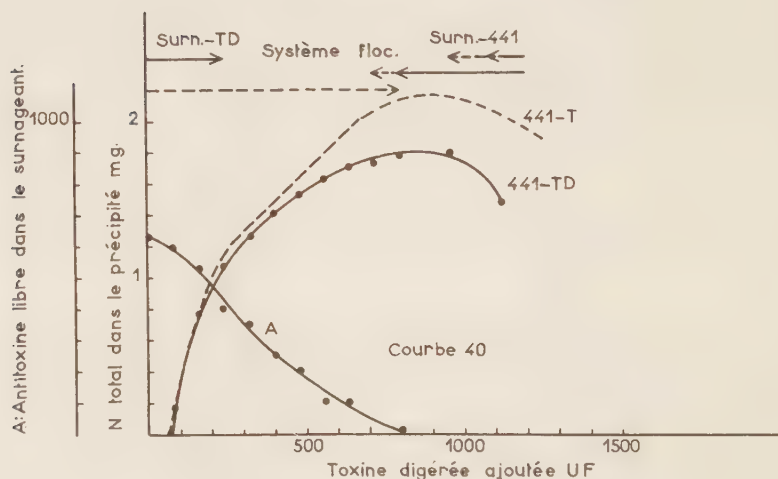


FIGURE 56. Courbe 40.

précipitation quantitative avec, comme antigène, T.D. épuisé par le sérum 825 (T.D.E.) et le sérum 906. Le précipité obtenu dépasse largement la différence entre ceux des systèmes 906 et 825. Nous avons pensé que dans le surnageant du système 825-T.D. se trouvaient des complexes antigène-anticorps solubles et que ces complexes étaient également précipités par le sérum 906. La courbe faite avec le sérum 825 et la toxine digérée est beaucoup plus basse que celle faite avec la toxine non digérée. La différence entre le poids moléculaire de la toxine non

digérée et celui de la fraction réagissant avec l'anticorps floculant ne peut pas en être la cause.

Pour vérifier si le complexe T.D.E.-906 contenait en partie des anticorps provenant du sérum 825, nous avons marqué le sérum 825 à l'iode radioactif, selon la méthode déjà décrite. Le précipité obtenu à l'optimum de floculation est fortement radioactif. Le surnageant reprécipité avec le sérum 906 est de nouveau radioactif. Le deuxième précipité contient donc des anticorps provenant du sérum 825. La figure 58 montre également la neutralisation du sérum 906 par T.D.E.

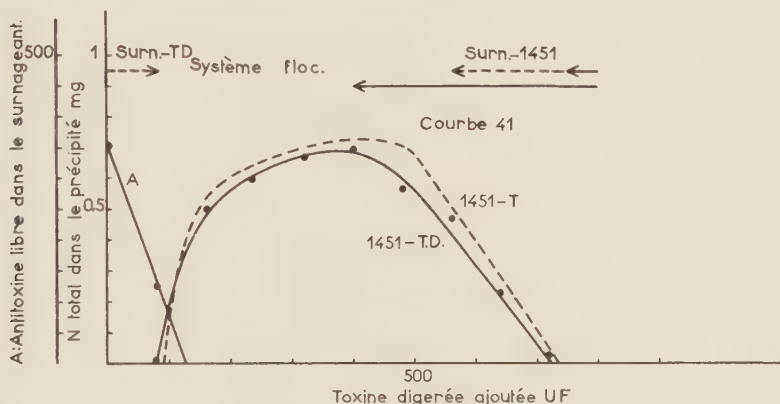


FIGURE 57. Courbe 41.

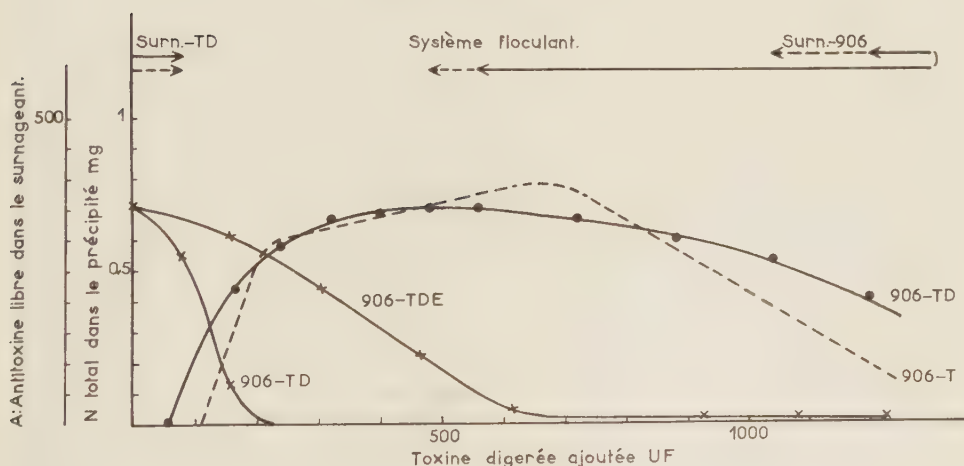


FIGURE 58. Courbe 42.

9. RÉSUMÉ

La digestion protéolytique de la toxine diphtérique a permis de mettre en évidence quelques-uns des groupements antigéniques situés sur la molécule de toxine. Il a été démontré que chacun de ces groupements donne naissance à un anticorps spécifique. Un sérum antidiphtérique est en réalité un mélange de divers types d'anticorps, chacun dirigé spécifiquement contre l'un des groupements antigéniques situés sur la toxine. Parmi ces groupements, il n'y en a qu'un seul qui soit associé à la toxicité de la molécule de toxine. Par suite de la digestion, la toxine perd sa toxicité, mais le groupement correspondant à cette toxicité continue à réagir avec l'anticorps spécifique, comme le fait une anatoxine. L'anticorps antitoxique est neutralisé par le groupement antigénique non toxique correspondant. L'anticorps qui donne naissance à la floculation, tel qu'on peut l'observer avec la toxine intacte est différent de l'anticorps neutralisant. La digestion trypsique effectuée dans les conditions décrites a permis le dépistage de trois anticorps distincts, présents dans l'antisérum antidiphtérique. Les sérums floculants peu neutralisants obtenus chez les chevaux sans immunité de base, contiennent seulement l'un de ces anticorps en quantité élevée: l'anticorps floculant. Le surnageant de la toxine digérée, épuisée par ces sérums est dépourvu d'antigènes floculants, mais neutralise toujours l'antitoxine.

Des expériences de précipitation en gel effectuées d'une part avec la toxine digérée et les divers antisérums étudiés, et d'autre part, les mêmes préparations épuisées, avec comme témoin la toxine non digérée, ont permis de caractériser les anticorps ainsi que les antigènes correspondants. Il résulte de ces études qu'il y a sur la toxine diphtérique des groupements antigéniques dont le pouvoir antigène absolu est plus élevé que celui du groupement antigénique qui amène la formation d'anticorps neutralisants. Ces résultats expliquent pourquoi les chevaux sans immunité de base sont de mauvais producteurs d'anticorps antitoxiques. Les chevaux à Schick négatif possèdent en faible quantité des anticorps neutralisants.

L'hyperimmunisation avec la toxine intacte est à considérer comme un rappel vis-à-vis du groupement antigénique toxique et amène la formation d'anticorps neutralisants en quantité élevée. La teneur en anticorps neutralisants par rapport aux anticorps floculants d'un sérum est un des facteurs qui déterminent les rapports *in vivo/in vitro* d'une antitoxine antidiphtérique.

L'immuno-électrophorèse effectuée avec la toxine digérée a montré la différence de mobilité électrophorétique des diverses fractions antigéniques distinctes. Les courbes de précipitation quantitative ont été effectuées avec la toxine digérée et les antitoxines déjà classées, appartenant à des groupes divers (antitoxines de mobilité γ ou β -2 globulines, antitoxines ayant des valeurs L_{+}/L_f élevées ou basses). Si l'on compare les courbes obtenues avec la toxine digérée et celles obtenues avec la toxine intacte, on voit que les résultats varient selon le type de sérum étudié. C'est le sérum 825 qui présente les plus grands écarts entre les deux courbes. L'étude des surnageants de ces courbes de précipitation quantitative effectuées avec la toxine digérée, montrent également que les anticorps sont présents en quantités variables et réagissent indépendamment les uns des autres avec les fractions antigéniques spécifiques présentes dans la préparation de toxine digérée. La courbe de précipitation quantitative résulte de la superposition de divers systèmes antigène-anticorps; les points d'équivalence de ces divers systèmes ne coïncident jamais exactement.

RÉSUMÉ ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Les caractéristiques de la toxine diphtérique pure ainsi que l'interprétation de la réaction toxine-antitoxine ont fait l'objet de nombreuses discussions.

Pappenheimer et Robinson ont interprété, il y a déjà 20 ans, la réaction toxine-antitoxine diphtérique et calculé la pureté immunologique de la toxine à partir de la pente de la zone rectiligne de la courbe de précipitation quantitative.

L'opinion de l'auteur anglais Pope est tout à fait opposée. La courbe de précipitation quantitative serait la superposition de plusieurs systèmes antigènes-anticorps précipitants. Les préparations de toxine, considérées comme étant de haute pureté, seraient en réalité encore très complexes. La toxine diphtérique serait dépourvue de pouvoir floculant et la floculation, réaction universellement employée pour le titrage *in vitro* de la toxine, une réaction entre des systèmes antigènes-anticorps autres que le système toxine-antitoxine diphtériques. Nous nous sommes proposés d'étudier les caractères de la toxine pure et de l'antitoxine correspondante et de réexaminer la réaction toxine-antitoxine.

Les filtrats de culture du bacille diphtérique contiennent, outre la toxine spécifique, de nombreux antigènes. Les sérums d'animaux hyperimmunisés avec l'anatoxine brute contiennent donc également à côté de l'antitoxine spécifique, de nombreux autres anticorps dirigés contre ces antigènes. Nous avons nommé ces anticorps : anticorps accessoires. Nous avons appelé antitoxine antidiphtérique, tous les anticorps qui réagissent spécifiquement avec la toxine ou l'anatoxine correspondante.

Les anticorps diphtériques ainsi définis peuvent être neutralisants ou non neutralisants, précipitants ou non précipitants, pourvu qu'ils possèdent la propriété de se combiner avec la toxine considérée comme une protéine de structure bien définie. Les anticorps neutralisants ont été appelés anticorps antitoxiques neutralisants ou antitoxine neutralisante.

Notre but était de purifier la toxine diphtérique et d'hyperimmuniser des chevaux avec des préparations de toxine pures. Nous avons pensé obtenir des préparations d'antitoxine dans lesquelles les anticorps accessoires seraient présents seulement en faible concentration. Il serait possible avec, d'une part la toxine

pure, et d'autre part l'antitoxine ainsi préparée, d'étudier la réaction toxine-antitoxine diphtériques, sans que les systèmes accessoires interviennent.

Le bacille diphtérique a été cultivé sur un milieu semi-synthétique à base d'hydrolysats de caséine. Les conditions de culture ont été déterminées et nous avons montré que pour obtenir une toxine destinée à être purifiée, la culture devait se faire dans des conditions bien définies. La production de toxine doit se faire au-dessous de l'optimum de fer; l'emploi de cultures de 8 jours est à conseiller.

La purification de la toxine diphtérique a été décrite. La toxine pure a été obtenue sous forme cristallisée, titrant 3 000 à 3 100 UF/mg N. Deux techniques de purification ont été employées: la première a été l'application de méthodes couramment utilisées pour la purification des protéines, à la purification de la toxine; une deuxième technique, la chromatographie sur phosphate de calcium, est l'application d'une nouvelle méthode de purification des protéines, à l'obtention de la toxine pure.

La chromatographie sur phosphate de calcium a permis de mieux connaître les conditions d'adsorption et d'éluion de la toxine. Il a été possible de mettre au point à partir de ces données, la technique de préparation d'un vaccin: l'anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate de calcium.

L'emploi des techniques de précipitation spécifique en gel ont permis de vérifier l'extrême complexité des antigènes diphtériques bruts et des antisérums correspondants. Nous avons employé la technique de double diffusion en gélose décrite par Oakley et Fulthorpe et par Ouchterlony.

Les sérums de chevaux hyperimmunisés avec la toxine brute contiennent 15 à 20 groupes d'anticorps distincts dirigés contre des antigènes diphtériques, un seul d'entre eux étant dirigé contre la toxine.

Nous avons testé les préparations de toxine au cours de la purification et montré que le nombre de constituants présents dans ces préparations diminue progressivement. Des préparations titrant 2 000 à 2 400 UF/mg N contiennent encore plusieurs antigènes distincts, comme l'a déjà montré Pope.

La toxine pure donne avec les sérums les plus complexes une seule ligne de précipitation spécifique en gel. Diverses expériences d'adsorption ont été faites pour prouver le caractère homogène de la toxine et de la réaction toxine-antitoxine diphtériques. Dans ce domaine, nous avons également eu recours à l'immuno-électrophorèse.

Des préparations de toxine brute contiennent des antigènes de mobilités électrophorétiques différentes. L'épuisement d'une toxine brute avec un sérum à une zone (sans anticorps accessoires) et vice-versa, l'épuisement d'un sérum complexe avec une toxine pure, supprime seulement une ligne de précipitation spécifique, correspondant à un constituant de mobilité électrophorétique bien déterminée.

La toxine diphtérique est une protéine constituée par des molécules de structure bien définie et semblables entre elles. La réaction toxine-antitoxine est une réaction entre cette molécule de toxine et les divers anticorps spécifiquement dirigés contre elle.

Les caractères physico-chimiques de la toxine ont été déterminés.

L'hyperimmunisation des chevaux a été effectuée avec des préparations de toxine à divers stades de pureté. Il a été démontré qu'au cours de l'hyperimmunisation, le nombre d'anticorps accessoires augmente. Même avec des anatoxines pures, il y

a formation d'anticorps accessoires, après une hyperimmunisation prolongée. On peut obtenir des antisérums qui contiennent uniquement l'antitoxine antidiphtérique, si l'on effectue une saignée avant la montée de ces anticorps accessoires, en général au début de l'hyperimmunisation. Certains chevaux hyperimmunisés avec des préparations de pureté moyenne, ne forment pas d'anticorps antitoxiques, mais uniquement des anticorps accessoires.

L'importance des anticorps accessoires mérite bien une mention parce qu'elle n'est pas universellement reconnue et qu'elle joue un rôle dans la préparation des antisérums et dans la vaccination. Cependant, elle ne pose pas de problèmes particuliers sur le plan théorique car elle reflète simplement la réaction immunitaire, l'hétérogénéité de la préparation antigène utilisée pour l'immunisation. Nous avons cependant démontré que les anticorps dirigés contre la toxine considérée comme un antigène unique sont très hétérogènes. Ces anticorps testés contre la toxine par les techniques de précipitation spécifique en gélose donnent une seule ligne.

Les différences qualitatives que l'on peut mettre en évidence dans ces préparations d'antitoxines diphtériques peuvent être classées de la façon suivante : 1) différences de mobilité électrophorétique entre les anticorps; 2) différences dans la forme des courbes de précipitation quantitative; 3) différences entre les taux d'anticorps précipitants et les taux d'anticorps non précipitants; 4) différences entre le pouvoir neutralisant des anticorps; 5) différences dans le mode de réaction avec une toxine partiellement digérée par une protéase.

1. DIFFÉRENCE DE MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE

Les anticorps antidiphtériques de cheval sont associés aux γ -globulines et aux β -2-globulines du sérum. La différence de mobilité électrophorétique des anticorps a été mise en évidence par la technique d'immuno-électrophorèse. L'antitoxine antidiphtérique de cheval est en général en fin d'hyperimmunisation une β -2-globuline, tandis qu'au début de l'hyperimmunisation, on la retrouve souvent uniquement dans la fraction γ -globuline. La valeur du rapport L_+/L_f ne présente pas de corrélation obligatoire avec la nature électrophorétique de l'antitoxine, quoiqu'elle soit, chez des chevaux à Schick négatif, en général plus élevée pour les γ -antitoxines que pour les β -2-antitoxines.

2. DIFFÉRENCES DANS LA FORME DES COURBES DE PRÉCIPITATION QUANTITATIVE

Il est connu depuis longtemps que la courbe de précipitation quantitative protéine-antiprotéine présente chez la plupart des espèces animales une forme en cloche (type précipitine, type lapin), tandis que chez le cheval, elle a une allure particulière : présence d'une zone rectiligne, solubilité du précipité dans un excès d'anticorps (type floculation, type cheval).

Nous avons pu établir, grâce aux divers sérums préparés par immunisation de chevaux avec l'anatoxine pure, que les deux types de courbes sont caractérisés non par l'espèce animale, mais par la nature électrophorétique des anticorps. Les

β -2-antitoxines de cheval donnent une courbe de type floculation, tandis que les γ -antitoxines de cheval, donnent une courbe en cloche désignée comme étant du type lapin. Des courbes faites avec des mélanges naturels ou artificiels de γ - et β -2-globulines présentent une allure intermédiaire. La présence de β -2-antitoxine dans une préparation de γ -antitoxines modifie l'aspect caractéristique de la courbe en faisant apparaître une solubilité plus ou moins prononcée du précipité spécifique dans la zone d'excès d'anticorps.

Les courbes de précipitation quantitative toxine-antitoxine diphtériques ont toujours été faites avec des sérums d'animaux hyperimmunisés pendant une longue période. Les antitoxines étaient donc toujours associées aux β -2-globulines, raison pour laquelle on n'a jamais rencontré la forme en cloche caractéristique des antitoxines γ -globulines. La courbe de précipitation quantitative a été étudiée avec des préparations de toxine pure ainsi qu'avec des toxines brutes concentrées.

Il a été démontré que si la préparation d'antitoxine ne contient pas d'anticorps accessoires, les courbes sont les mêmes, tandis que dans le cas contraire, la différence entre les courbes faites avec une toxine brute ou pure peut devenir significative. Dans ce dernier cas, il y a précipitation des systèmes accessoires qui se surajoutent au précipité toxine-antitoxine. L'azote précipitable devient beaucoup plus élevé.

La composition moléculaire antitoxine/toxine des précipités a été déterminée. Les β -2-antitoxines floculent pour un rapport antitoxine-toxine = environ 2,2, tandis que les γ -antitoxines ont à l'optimum de floculation, un rapport supérieur à 4.

La digestion du sérum total ou du précipité spécifique à l'optimum de floculation des antitoxines β -2-globulines ne change pas d'allure générale de la courbe de précipitation quantitative, mais renforce au contraire le caractère floculation. Le taux d'azote du précipité spécifique diminue évidemment parallèlement à la baisse du poids moléculaire que subit la molécule de globuline à la suite de la digestion.

La solubilité du précipité spécifique des β -2-antitoxines en excès d'anticorps est supprimée si l'on effectue les courbes de précipitation quantitative en milieu salin concentré. Nous avons utilisé comme solution saline concentrée le phosphate monodipotassique 1,0 M et 1,4 M de pH = 7,0. Les sérums digérés ne donnent aucun précipité non spécifique pour cette concentration saline.

Les courbes de précipitation quantitative présentent maintenant une zone rectiligne très étendue. La pente de la zone rectiligne permet de calculer la pureté immunologique de la toxine, conformément à la théorie de Pappenheimer.

3. DIFFÉRENCE ENTRE LES TAUX D'ANTICORPS PRÉCIPITANTS ET NON PRÉCIPITANTS

La présence à taux élevé d'anticorps non précipitants neutralisants dans un sérum, a pour effet d'augmenter le rapport du titre *in vivo/in vitro* (L_+/L_f) du sérum. L'existence d'anticorps non précipitants dans les sérums de chevaux a été signalée à plusieurs reprises.

Nous avons recherché la présence des anticorps non-précipitants par l'emploi d'une toxine pure marquée à l' ^{131}I . Les conditions de marquage employées ont permis d'obtenir des toxines radioactives dont les pouvoirs floculants et toxiques

n'avaient pas diminué. Nous avons trouvé que le taux d'anticorps non précipitants est relativement faible pour les sérums natifs ainsi que pour les sérums digérés, à condition que ces sérums proviennent de chevaux à Schick négatif.

L'hyperimmunisation de chevaux sans immunité de base amène la formation d'anticorps non précipitants en quantités plus élevées. L'emploi de la toxine radioactive a également permis de vérifier la théorie de Pappenheimer. Il a été trouvé que tout au long de la zone rectiligne, la quantité de toxine précipitée est proportionnelle à la toxine ajoutée. L'emploi des antitoxines marquées a montré que, au long de cette zone rectiligne, la quantité d'anticorps dans le précipité reste à peu près constante.

La présence de complexes de toxine-antitoxine solubles en faible quantité au début de la zone rectiligne a été démontrée; ces complexes sont précipités pour des quantités plus élevées de toxine. C'est une des raisons pour lesquelles en général, la pente de la zone rectiligne ne correspond pas à celle d'une toxine pure. Les complexes solubles sont également précipités si la courbe est effectuée en milieu salin concentré.

4. DIFFÉRENCE DANS LE POUVOIR NEUTRALISANT DES ANTICORPS

Il a été admis que dans le système toxine-antitoxine diphtériques, le pouvoir neutralisant évolue toujours parallèlement au pouvoir précipitant. L'existence d'anticorps non neutralisants qui précipitent spécifiquement la toxine n'a, à notre connaissance, jamais été signalée. Il faut admettre qu'il a été assez difficile, jusqu'à maintenant, de les mettre en évidence, parce qu'on doit être sûr au préalable que la précipitation n'est pas due aux systèmes accessoires.

Les techniques de précipitation spécifique en gel ont permis de dépister l'existence des systèmes accessoires et de prouver qu'une toxine pure ne donne qu'une ligne de précipitation quantitative avec les sérums complexes. Ce sont ces toxines qui ont été employées pour étudier et mettre en évidence les anticorps non neutralisants.

Les chevaux sans immunité de base, hyperimmunisés avec l'anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium, ont tous présenté au début de l'hyperimmunisation ce fait inattendu : la formation d'anticorps floculants, seulement faiblement neutralisants. Si l'hyperimmunisation était prolongée pendant une assez longue période, la formation d'anticorps neutralisants augmentait et les valeurs *in vivo* et *in vitro* se rapprochaient pour finir par être égales. Les anticorps précipitants dépourvus de pouvoir neutralisant ont été trouvés dans la fraction des γ -globulines et dans la fraction des β -2-globulines. Les courbes de précipitation quantitative étaient de type floculation ou de type précipitine, conformément à la mobilité électrophorétique des anticorps. Les propriétés floculantes et neutralisantes n'évoquent donc pas de façon parallèle, comme si elles étaient déterminées par des groupes antigènes différents situés sur la molécule de toxine ou d'anatoxine.

L'étude des courbes de précipitation quantitative a démontré que les précipités formés sont toxiques à partir du point L_+ , lequel se trouve dans la région d'excès d'anticorps. Il s'agit donc d'un phénomène analogue à celui observé pour certains systèmes enzymes-antienzymes, où le précipité spécifique peut contenir tout le pouvoir enzymatique.

La formation d'anticorps précipitants et neutralisants se fait de façon assez parallèle chez des chevaux à immunité de base. Des sérums contenant des quantités élevées d'anticorps neutralisants par rapport aux anticorps floculants, ont été rencontrés. Les valeurs *in vivo/in vitro* (L_+ /Lf) d'une antitoxine sont donc déterminées par : a) La présence d'anticorps non précipitants neutralisants dans les antitoxines. Il faut signaler que les anticorps précipitants peuvent se transformer en anticorps non précipitants par vieillissement des sérums ou par relargage répété des antitoxines. b) La présence d'anticorps précipitants non neutralisants. La quantité absolue de ces anticorps peut être très élevée, les valeurs *in vivo/in vitro* de ces préparations d'antitoxines sont très basses. c) La nature électrophorétique des anticorps. Les anticorps γ -globulines souvent rencontrés au début de l'hyperimmunisation chez des chevaux à immunité de base, ont en général un rapport *in vivo/in vitro* élevé. Ce rapport élevé n'a pas seulement pour cause la présence en quantité élevée d'anticorps neutralisants, mais est également conditionné par le fait que ces anticorps ont leur optimum de floculation dans une zone d'excès d'anticorps.

Le titre déterminé *in vitro* ne correspond pas au maximum de la courbe de précipitation quantitative comme c'est en général le cas avec des antitoxines γ -globulines d'autres espèces animales, par exemple, des antitoxines de lapin.

5. DIFFÉRENCE DANS LE MODE DE RÉACTION AVEC UNE TOXINE PARTIELLEMENT DIGÉRÉE PAR UNE PROTÉASE

Nous avons eu diverses raisons de supposer que la structure antigénique de la toxine diphtérique comprend plusieurs groupements distincts faisant partie de la molécule de toxine. Il y aurait formation d'anticorps spécifiques dirigés contre chacun de ces groupements, mais un seul d'entre eux donnerait naissance aux anticorps neutralisants.

Les résultats des expériences effectuées avec la toxine partiellement digérée par la trypsine sont en faveur de cette hypothèse.

Une toxine qui donne une seule ligne de précipitation spécifique en gélose si elle est testée contre un sérum hyperimmun, en donne plusieurs si elle a été dissociée par la trypsine dans les conditions décrites. Toutes les lignes formées rejoignent celles de la toxine intacte employée comme témoin. Nous appelons des divers groupements antigéniques $t, t_1, t_2 \dots t_n$, un seul d'entre eux, que nous désignons par t , donne naissance à des anticorps neutralisants a ; les autres anticorps $a_1, a_2 \dots a_n$ sont dépourvus de pouvoir neutralisant¹. Lorsque la toxine T est intacte, le système T (antigène unique) — $a, a_1, a_2 \dots a_n$ se comporte dans les tests de diffusion en gélose comme un système unique et donne une seule ligne. Si par contre, la molécule de toxine T est coupée en fragments et que ces fragments portent un ou plusieurs des groupements antigéniques, ces fractions de molécule réagissent indé-

1. Il faut aussi considérer que les anticorps dirigés contre un motif antigénique ne sont pas obligatoirement les mêmes. Les anticorps peuvent être plus ou moins bien adaptés au motif antigénique, donner des liaisons de forces inégales ou avoir des valences différentes.

Nous avons déjà montré que les anticorps sont en partie non précipitants, mais nous n'avons pas étudié plus en détails les différences entre les anticorps dirigés contre le même motif antigénique.

pendamment les unes des autres avec les anticorps spécifiquement dirigés contre elles. Dans les tests de double diffusion en gélose, il y aura donc autant de lignes qu'il y a de nouveaux systèmes « antigènes-anticorps spécifiques » et une réaction d'identité avec la ligne unique toxine (T) - antitoxine antidiphthérique.

Les diverses antitoxines que nous avons examinées n'ont pas toutes donné les mêmes résultats avec la toxine digérée. Toutes les antitoxines ayant un rapport *in vivo* / *in vitro* élevé ont donné deux lignes très denses avec la toxine digérée; une troisième ligne plus faible devient visible pour des concentrations élevées en toxine digérée. Les antitoxines ayant un rapport *in vivo* / *in vitro* bas, testées contre la toxine digérée, donnent une seule ligne très dense, identique à une des lignes denses du système précédent. Appelons ce système t_1-a_1 . La toxine digérée floccule avec les deux types d'antitoxines.

Les faits suivants ont été démontrés avec la toxine digérée épuisée à l'optimum de floculation par un sérum peu neutralisant (rapport *in vivo* / *in vitro* = L_+/L_f , très bas). a) Le surnageant que nous appelons T.D.E. ne réagit plus avec le dernier sérum; il n'y a plus formation de la ligne t_1-a_1 . b) Si l'on teste T.D.E. contre un sérum ayant un rapport *in vivo* / *in vitro* élevé, on voit que la ligne qui était identique au système t_1-a_1 a également disparu. La deuxième ligne dense, toujours présente dans ces sérums, n'a pas subi de changement. c) Les tests *in vivo* montrent que le T.D.E. est capable de neutraliser l'antitoxine. Par suite de cette neutralisation, il n'y a plus de formation de précipité entre T.D.E. et l'antitoxine. Nous avons associé cette neutralisation sans en donner une autre preuve au système $t-a$. d) Le temps de floculation de la toxine digérée a subi une augmentation par suite de la digestion. Néanmoins la toxine digérée floccule encore très bien et le flocculat a tous les aspects de celui qu'on observe habituellement entre la toxine et l'antitoxine diphthériques. T.D.E. ne floccule plus avec les sérums de rapport L_+/L_f élevé. Après une nuit à 45°, il y a formation d'un précipité, mais l'aspect de ce précipité très fin, est tout à fait différent du flocculat habituel. Nous avons associé la floculation observée entre la toxine et l'antitoxine antidiphthérique au système t_1-a_1 . Diverses autres expériences ainsi que l'établissement des courbes de précipitation quantitative entre les toxines digérées et les divers sérums, ont confirmé ces résultats.

Les divers anticorps $a, a_1 \dots a_n$ présents en proportions variables dans les sérums réagissent indépendamment les uns des autres avec les antigènes spécifiques. Les courbes de précipitation quantitative faites avec la toxine digérée résultent de la superposition des précipités formés entre les systèmes $t-a, t_1-a_1$, etc... A partir de ces résultats, nous pouvons formuler l'hypothèse suivante : Les différences entre le pouvoir neutralisant et le pouvoir flocculant des sérums antidiphthériques ne sont pas dues à des différences de qualités mal définies entre les sérums, mais tiennent uniquement à des différences entre les anticorps neutralisants et non neutralisants des sérums.

Les sérums peu neutralisants ont été souvent désignés comme sérums non avides ou sérums contenant des anticorps mal adaptés au motif antigénique. Nous pensons qu'il n'y a pas d'anticorps non avides mais seulement des sérums non avides; ces sérums contiendraient donc peu d'anticorps neutralisants. L'isolement des fractions t, t_1, t_2 , etc... sous forme immunologiquement pure, doit donc permettre de préparer leurs anticorps spécifiques par hyperimmunisation des animaux.

L'immunisation avec le groupe antigénique t isolé, permettra très probablement

la préparation de sérums qui contiendront uniquement des anticorps pourvus d'un haut pouvoir neutralisant ainsi que celle d'un vaccin d'une grande efficacité.

Les résultats obtenus avec le système toxine-antitoxine nous permettent même de formuler des hypothèses relatives aux autres systèmes immunologiques. On peut se demander si les résultats obtenus avec le système toxine-antitoxine ne peuvent pas être appliqués plus généralement à la sérothérapie antimicrobienne et à la sérothérapie antivirale. Les résultats spectaculaires obtenus avec des antitoxines n'ont pas jusqu'à maintenant justifié les espoirs qu'on avait placés dans l'application générale de la sérothérapie.

L'activité biologique est située dans une certaine région bien limitée de la protéine; à côté du groupe antigénique correspondant existent plusieurs autres groupes. Si ces derniers groupes sont de meilleurs antigènes, la réponse immunitaire peut être déséquilibrée de façon à ce qu'il n'y ait pas de formation d'anticorps neutralisants. Les préparations employées pour l'immunisation sont en général loin d'être pures, les mêmes observations sont valables pour les protéines accessoires, de sorte que la possibilité d'obtenir des anticorps neutralisants devient très limitée. On peut se demander si les difficultés rencontrées dans la préparation de sérums neutralisants à titre élevé vis-à-vis des endotoxines et des virus ne relèvent pas de ce mécanisme. L'emploi comme antigènes des protéines pures ou d'un de leurs produits de dégradation encore antigénique et ne comprenant que le groupe utile, devrait permettre d'obtenir des sérums de pouvoir neutralisant beaucoup plus élevé.

ABRÉVIATIONS ET UNITÉS

A : Antitoxine diphtérique.

T : Toxine diphtérique pure.

U : Ensemble des antigènes présents dans le filtrat de culture de *Corynebacterium diphtheriae* concentrés par ultrafiltration.

M : Ensemble des antigènes présents dans le filtrat de culture de *Corynebacterium diphtheriae* concentrés par précipitation à l'acide métaphosphorique.

Protéines-P : Protéines du filtrat de culture de *Corynebacterium diphtheriae* en excès de fer.

T.D. : Toxine digérée (cf. chapitre VII).

S.H.N. : Sérum humain normal.

S.C.N. : Sérum de cheval normal.

L.A.C. : Sérum de lapin anti-sérum de cheval.

D.M.M. = M.L.D. : La plus petite quantité de toxine diphtérique qui injectée par voie sous-cutanée à un cobaye de 250 g provoque la mort en 96 heures, est égale à 1 D.M.M. (dose minima mortelle).

U.A. = A.E. = U.I. : Unité internationale d'antitoxine. C'est la quantité d'antitoxine contenue dans un certain poids du sérum étalon de Copenhague. Pour un sérum inconnu, l'unité antitoxique se définit comme la quantité d'antitoxine qui possède le même pouvoir de combinaison totale avec la toxine (et les toxoïdes éventuels) qu'une unité internationale. La détermination du pouvoir neutralisant d'un sérum de titre inconnu se fait par l'intermédiaire d'un étalon de toxine. Les unités de toxine employées sont les doses L_0 , L_+ et L_r .

L_+ : La dose L_+ de toxine est la quantité de toxine qui, mélangée à 1 U.I., donne un mélange contenant un excès de toxine libre, égal à 1 D.M.M.

L_r : La dose L_r de toxine est la quantité de toxine qui, mélangée à 1 U.I. et injectée au cobaye par voie intradermique sous le volume de 0,2 ml, contient l'excès de toxine libre juste suffisant pour provoquer une lésion cutanée de diamètre donné.

L_0 : La dose L_0 de toxine est la quantité maxima de toxine qui, mélangée à 1 U.I., ne provoque l'apparition d'aucun symptôme (dans un délai fixe d'observation), lorsqu'on injecte le mélange à un animal donné.

UF = L_f : Unité de floculation. C'est la quantité de toxine ou d'anatoxine qui, mélangée au sérum étalon de floculation de Copenhague, flocule le plus rapidement. La floculation d'un sérum de titre inconnu se fait par l'intermédiaire d'une toxine

(ou anatoxine) de titre connu. La floculation (titrage *in vitro*) des toxines et des antitoxines se fait avec les sérums de chevaux, par la technique de Ramon (cf. page 76).

K_f : Temps nécessaire pour la floculation initiale, déterminée à 45° C.

L_+/L_f : Rapport des unités antitoxiques, déterminées *in vivo* (intermédiaire : étalon de toxine 1 L_+) et *in vitro* (floculation par la technique de Ramon).

D.M.R. : cf. page 86¹.

β -2-antitoxine : Antitoxine antidiphtérique ayant la mobilité électrophorétique d'une β -2-globuline (cf. page 68).

γ -antitoxine : Antitoxine antidiphtérique ayant la mobilité électrophorétique d'une γ -globuline (cf. page 68).

1. Pour une description détaillée des techniques de titrage *in vivo* et *in vitro* des toxines et des antitoxines diphtériques, voir Topley et Wilson (*Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, by Wilson E.S. and Miles A.A. - Edward Arnold Publ. LTD, London - Fourth Edition - 1955, p. 1594).

BIBLIOGRAPHIE

1. ABRAMOFF P. et WOLFE H.R. Precipitin production in chickens. XIII. A quantitative study of the effect of simultaneous injection of two antigens. *J. Immunol.*, 1956, 77, 94.
2. ADLER F.L. Antibody formation after injection of heterologous immune globulin. II. Competition of antigens. *J. Immunol.*, 1957, 78, 201.
3. AGNER K. Studies on peroxidative detoxification of purified diphtheria toxin. *J. exp. Med.*, 1950, 92, 337.
4. AMIENS C.R. Bacterial variation and toxin production by *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Path. Bact.*, 1948, 60, 595.
5. AMOUREUX G. et YEU F. Purification des sérums antitoxiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 80, 165.
6. D'ANTONA D. et PIAZZI S. Effets de la variation quantitative et qualitative des stimuli antigéniques primaires et secondaires. Mécanisme d'action des adjuvants de l'immunité. *Rev. Immunol.* (Paris), 1956, 20, 317.
7. ASCOLI M. Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung und der Eiweisskörper des Blutserums. *Münch. med. Wschr.*, 1902, 49, 1409.
8. ASCOLI M. et VALENTI E. Biologische Milzbranddiagnose. *Z. Infektkr., Paras. Kr., Hyg. Haustiere*, 1910, 7, 375.
9. AUGUSTIN R., HAYWARD B.J. et SPIERS J.A. Antigen-antibody reactions in agar. I. Experimental tests of current theories of Oudin's single diffusion method. *Immunology*, 1958, 1, 67.
10. BARR M. et GLENNY A.T. Further observations on qualitative differences in antitoxic fractions prepared from the sample of plasma. *Brit. J. exp. Path.*, 1931, 12, 337.
11. BARR M. et GLENNY A.T. Abnormal flocculation reactions with diphtheria toxoid. *J. Path. Bact.*, 1938, 47, 27.
12. BARR M. et LLEWELLYN-JONES M. Some factors influencing the response of animals to immunization with combined prophylactics. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, 34, 12.
13. BARR M. et LLEWELLYN-JONES M. Interference with antitoxic responses in immunization with combined prophylactics. *Brit. J. Exp. Path.*, 1953, 34, 233.
14. BARR M. et LLEWELLYN-JONES M. Some factors influencing the response to immunization with single and combined prophylactics. *Brit. J. exp. Path.*, 1955, 36, 147.
15. BECKER E.L., MUNOZ J., LAPRESLE Cl. et LE BEAU L.J. Antigen-antibody reactions in agar. II. Elementary theory and determination of diffusion coefficients of antigen. *J. Immunol.*, 1951, 67, 501.
16. BEHRING E. (von) et KITASATO S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren. *Dtsch. med. Wschr.*, 1890, 16, 1113.
17. BEHRING E. (von). Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität bei Tieren. *Dtsch. med. Wschr.*, 1890, 16, 1145.

18. BEHRING E. (von). Ueber ein neues Diphtherieschützmittel. *Dtsch. med. Wschr.*, 1913, 39, 873.
19. BINGEL A. Ueber Behandlung der Diphtherie mit gewöhnlichem Pferdeserum. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1918, 125, 284.
20. BINGEL A. Zur Behandlung der Diphtherie mit gewöhnlichem Pferdeserum. *Dtsch. med. Wschr.*, 1919, 45, 739.
21. BOIVIN A. et IZARD Y. Méthode pour la purification à l'acide trichloracétique des toxines et anatoxines diphthériques, tétaniques et staphylococciques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1937, 124, 25.
22. BORDET J. Le mécanisme de l'agglutination. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, 13, 225.
23. BOWEN H.E. The homogeneity of purified diphtheria toxins and toxoids as investigated by the semi-solid precipitin technic. *J. Immunol.*, 1952, 68, 429.
24. BOWEN H.E. et WYMAN L. On the lack of agreement of the constant toxin and constant antitoxin flocculation reaction of diphtheria toxin and equine antitoxin. *J. Immunol.*, 1953, 70, 235.
25. BOWEN H.E. et WYMAN L. The flocculation reaction of rabbit antibody. *J. Immunol.*, 1953, 71, 86.
26. BOWEN H.E., POLLEY B.A. et HUANG J. The quantitative precipitin reaction of equine diphtheria antitoxin. *J. Immunol.*, 1954, 72, 112.
27. BOYD W.C. et HOOKER S.B. The influence of the molecular-weight of antigen on the proportion of antibody to antigen in precipitates. *J. gen. Physiol.*, 1934, 17, 341.
28. BOYD W.C. et HOOKER S.B. The influence of the molecular weight of antigen on the proportion of antibody to antigen in precipitates. II. A statistical examination of available data, including some previously unpublished. *J. gen. Physiol.*, 1939, 22, 281.
29. BOYD W.C. Influence of character of antibody upon velocity of flocculation. *J. exp. Med.*, 1941, 74, 369.
30. BOYD W.C. et PURNELL M.A. The essential difference between the two optimum proportions flocculation ratios. *J. exp. Med.*, 1944, 80, 289.
31. BOYD W.C. *Fundamentals of Immunology*, 3d Edition, Interscience Publishers Inc., New York, 1956.
32. BOYDEN S.V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.*, 1951, 93, 107.
33. BOYDEN A. Fifty years of systematic serology. *Systematic Zoology*, 1953, 2, 19.
34. BOZICEVICH J., TOBIE J.E., THOMAS E.H., HOYEM H.M. et WARD S.B. A rapid flocculation test for the diagnosis of Trichinosis. *Public Hlth Rep. (Wash.)*, 1951, 66, 806.
35. BREINL F. et HAUROWITZ F. Chemische Untersuchungen des Präzipitates aus Hämoglobin und anti-Hämoglobinsерum und Bemerkungen über die Natur der Antikörper. *Z. physiol. Chem.*, 1930, 192, 45.
36. BROWN W. On the preparation of collodion membranes of differential permeability. *Biochem. J.*, 1915, 9, 591.
37. BUNNEY W.E., CIANCARULO J. et KIAMIL M. A study of the acid precipitation of diphtheria toxin. *J. Immunol.*, 1931, 20, 417.
38. BURNET F.M. The interactions of staphylococcus toxin, anatoxin and antitoxin. *J. Path. Bact.*, 1931, 34, 471.
39. BURTIN P. Coexistence de complexes précipitants et non précipitants dans la réaction entre la sérum-albumine humaine et les immunosérums spécifiques de chevaux. Déductions quantitatives et conséquences théoriques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, 37, 977.
40. BUTLER A.M. et MONTGOMERY H. The solubility of the plasma proteins. I. Dependence on salt and plasma concentrations in concentrated solutions of potassium phosphate. *J. biol. Chem.*, 1932, 99, 173.
41. CALMETTE A. et MASSOL L. Les précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de cobra. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, 23, 155.

42. CANNON P.R. et MARSHALL Ch.E. An improved serologic method for the determination of the precipitative titers of antisera. *J. Immunol.*, 1940, 38, 365.
43. CELAREK J. et POREBSKI W. Réaction de Shick appliquée à la production des sérums chez les chevaux. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1928, 99, 1017.
44. CINADER B. et WEITZ B. β - and γ -globulin tetanus antitoxin of the hyperimmune horse. *Nature (Lond.)*, 1950, 166, 785.
45. CINADER B. et WEITZ B. The interaction of tetanus toxin and antitoxin. *J. Hyg. (Lond.)*, 1953, 51, 293.
46. CINADER B. Antigen-antibody interaction using enzymes as antigens. *Biochem. Soc. Symposia*, 1953, n° 10, p. 16.
47. CINADER B. Etude de la réaction enzyme-antienzyme. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1955, 37, 761.
48. CINADER B. et PEARCE J.H. Immuno-chemical studies on bovine ribonuclease. *Brit. J. exp. Path.*, 1956, 37, 541.
49. CINADER B. Antibodies against enzymes. *Ann. Rev. Microb.*, 1957, 11, 371.
50. COHN E.J. The physical chemistry of proteins. *Physiol. Rev.*, 1925, 5, 349.
51. COHN M. et PAPPENHEIMER A.M. A quantitative study of the diphtheria toxin-antitoxin reaction in the sera of various species including man. *J. Immunol.*, 1949, 63, 291.
52. COHN M. Techniques and analysis of the quantitative precipitation reaction. A. Réaction in liquid media. *Methods in Medical Research*, The Year Book Publis., Chicago, 1952, vol. 5, p. 301.
53. COLWELL C.A. et YOUNG C.P. The relationship between constant antiserum and constant antigen optimal ratios obtained with rat and guinea-pig precipitin. *J. Immunol.*, 1941, 42, 79.
54. CULBERTSON J.T. A quantitative study of the precipitin reaction with special reference to crystalline egg albumin and its antibody. *J. Immunol.*, 1932, 23, 439.
55. DANYSZ J. Contribution à l'étude des propriétés de la nature des mélanges des toxines avec leurs antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, 16, 331.
56. DEAN H.R. et WEBB R.A. The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. *J. Path. Bact.*, 1926, 29, 473.
57. DERRIEN Y. Individualisation, caractérisation and fractionation of the serum proteins by salting-out. *Särtryck ur Svensk Kemisk Tidskrift*, 1947, 59, 139.
58. DEUTSCH H.F. et NICHOL J.C. Biophysical studies of blood plasma proteins. X. Fractionation studies of normal and immune horse serum. *J. biol. Chem.*, 1948, 176, 797.
59. DEUTSCH H.F., NICHOL J.C. et COHN M. Biophysical studies of blood plasma proteins. XI. Immunological and electrophoretic studies of immune chicken serum. *J. Immunol.*, 1949, 63, 195.
60. DITTEBRANDT M. Application of the Weichselbaum biuret reagent to the determination of spinal fluid protein. *Am. J. Clin. Path.*, 1948, 18, 439.
61. DREW R.M. et MUELLER J.H. A chemically defined medium suitable for the production of high titer diphtherial toxin. *J. Bact.*, 1951, 62, 549.
62. DUNCAN J.T. The use of equivalent proportions of antigen and serum in absorption of precipitin. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, 489.
63. EATON M.D. The purification and concentration of diphtheria toxin. I. Evaluation of previous methods; description of a new procedure. *J. Bact.*, 1936, 31, 347.
64. EATON M.D. The purification and concentration of diphtheria toxin. II. Observations on the nature of the toxin. *J. Bact.*, 1936, 31, 367.
65. EISEN H.N. Ultraviolet absorption spectroscopy of immune precipitates. *J. Immunol.*, 1948, 60, 77.
66. EISEN H.N. et KESTON A.S. The immunologic reactivity of bovine serum albumin labelled with trace amounts of radioactive iodine (131). *J. Immunol.*, 1949, 63, 71.
67. EISLER M. (von) et LÖWENSTEIN E. Ueber Formalinwirkung auf Tetanustoxin und andere Bakterientoxine. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1912, 61, 271.

68. EISLER M. (von). Ueber Immunisierung mit durch Formaldehyd verändertem Tetanus-toxin. *Wien. klin. Wschr.*, 1915, 28, 1223.
69. EISLER M. et EIBL H. Ueber die Wirkungsweise der Aluminium-Diphtherieimpfstoffe. *Med. Klin.*, 1949, 4, 441.
70. FARAGÓ F. Ueber das Schicksal und die Wirksamkeit des Anatoxin-Präzipitatdepots in Organismus. *Z. ImmunForsch.*, 1935, 86, 191.
71. FERRE M. Du pouvoir immunisant contre la diphtérie du sérum de cheval normal. *Bull. méd. (Paris)*, 1896, 10, 773.
72. FISCHER S. The estimation in vitro of small amounts of diphtheria antitoxin by means of a haemagglutination technique. *J. Hyg. (Lond.)*, 1952, 50, 445.
73. FREUND J. et McDERMOTT K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1942, 49, 548.
74. FREUND J. et BONANTO M.V. The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheric toxoid and Bact. Typhosum. *J. Immunol.*, 1944, 48, 325.
75. FREUND J. Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1947, 1, 291.
76. GITLIN D. Use of ultraviolet absorption spectroscopy in the quantitative precipitin reaction. *J. Immunol.*, 1949, 62, 437.
77. GITLIN D. et EDELHOCH H. A study of the reaction between human serum albumin and its homologous equine antibody through the medium of light scattering. *J. Immunol.*, 1951, 66, 67.
78. GLENNY A.T. et WALPOLE G.S. Detection and concentration of antigens by ultrafiltration, pressure dialysis, etc... with special reference to diphtheria and tetanus toxins. *Biochem. J.*, 1915, 9, 298.
79. GLENNY A.T. et SÜDMERSEN H.J. Notes on the production of immunity to diphtheria toxin. *J. Hyg. (Lond.)*, 1921, 20, 176.
80. GLENNY A.T. et HOPKINS B.E. Diphtheria toxoid as an immunizing agent. *Brit. J. exp. Path.*, 1923, 4, 283.
81. GLENNY A.T. Diphtheria antitoxin in the blood of normal horses. *J. Path. Bact.*, 1925, 28, 241.
82. GLENNY A.T. The relation between dosage and death-time. *J. Path. Bact.*, 1925, 28, 251.
83. GLENNY A.T., POPE C.G. et WADDINGTON H. The measurement of the combining power of diphtheria toxin and toxoid with antitoxin in relation to their antigenic efficacy. *J. Path. Bact.*, 1925, 28, 279.
84. GLENNY A.T., POPE C.G., WADDINGTON H. et WALLACE U. Immunological notes VIII-XVI. *J. Path. Bact.*, 1925, 28, 463.
85. GLENNY A.T., POPE C.G., WADDINGTON H. et WALLACE U. Immunological notes. Note XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Path. Bact.*, 1926, 29, 38.
86. GLENNY A.T. et WADDINGTON H. Combined Schick test and diphtheria prophylactic; combined diphtheria-scarletfever prophylactic. *J. Path. Bact.*, 1926, 29, 118.
87. GLENNY A.T. et BARR M. Alum-toxoid precipitates as antigens. *J. Path. Bact.*, 1931, 34, 118.
88. GLENNY A.T. et BARR M. The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum. *J. Path. Bact.*, 1931, 34, 131.
89. GLENNY A.T., BUTTLE G.A.H. et STEVENS M.F. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J. Path. Bact.*, 1931, 34, 267.
90. GLENNY A.T., BARR M., ROSS H.E. et STEVENS M.F. The influence of avidity upon standardization of antitoxins. *J. Path. Bact.*, 1932, 35, 495.
91. GOLDBERG R.J. et CAMPBELL D.H. The light-scattering properties of an antigen-antibody reaction. *J. Immunol.*, 1951, 66, 79.

92. GOLDBERG R.J. A theory of antibody-antigen reactions. I. Theory for reactions of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody. *J. Amer. chem. Soc.*, 1952, 74, 5715.
93. GONZALEZ P. et ARMANQUÉ M. Les lipoides dans l'immunité. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1931, 106, 1006.
94. GOODNER K. Collodion fixation; a new immunological reaction. *Science*, 1941, 94, 241.
95. GORDON A.H., KEIL B., SEBESTA K., KNESSL O. et SORM F. Electrophoresis of proteins in agar jelly. *Coll. Trav. Chim. Tchecosl.*, 1950, 15, 1.
96. GRABAR P. et WILLIAMS C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. biophys. Acta*, 1953, 10, 193.
97. GRABAR P. Etudes sur les protéines à l'aide de méthodes immuno-chimiques. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1954, 36, 65.
98. GRABAR P. Etude de mélanges de protéines par analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. *Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry, Brussels*, 1955, p. 37. Academic Press Inc., Publis.-New York, 1956.
99. GRABAR P. et WILLIAMS C.A. Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. biophys. Acta*, 1955, 17, 67.
100. GUNDEL M. et KÖNIG F. Experimentelle Untersuchungen zur aktiv-passiven Immunisierung gegen Diphtherie. *Z. Immun. Forsch.*, 1938, 92, 235.
101. HARRISON W.T. Some observations on the use of alum precipitated diphtheria toxoid. *Amer. J. publ. Hlth.*, 1935, 25, 298.
102. HAUROWITZ F. et SCHWERIN P. The specificity of antibodies to antigens containing two different determinant groups. *J. Immunol.*, 1943, 47, 111.
103. HEIDELBERGER M., KENDALL F.E. et Soo-Hoo C.M. Quantitative studies on the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo-protein. *J. exp. Med.*, 1933, 58, 137.
104. HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E. The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. II. Conditions for quantitative precipitation of antibody in horse sera. *J. exp. Med.*, 1935, 61, 559.
105. HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E. The precipitin reaction between Type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. III. A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. *J. exp. Med.*, 1935, 61, 563.
106. HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E. A quantitative theory of precipitin reaction. III. The reaction between crystalline egg albumin and its homologous antibody. *J. exp. Med.*, 1935, 62, 697.
107. HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E. A quantitative theory of precipitin reaction. V. The reaction between crystalline horse serum albumin and antibody formed in the rabbit. *J. exp. Med.*, 1937, 66, 229.
108. HEIDELBERGER M., TREFFERS H.P. et MAYER M. A quantitative theory of the precipitin reaction. VII. The egg albumin-antibody reaction in antisera from the rabbit and horse. *J. exp. Med.*, 1940, 71, 271.
109. HEIDELBERGER M. et MAYER M. Quantitative chemical studies on complement or alexin. IV. Addition of human complement to specific precipitates. *J. exp. Med.*, 1942, 75, 285.
110. HEIDELBERGER M., McPHERSON C.F.C. Quantitative micro-estimation of antibodies in the sera of man and other animals. *Science*, 1943, 97, 405.
111. HEIDELBERGER M. et McPHERSON C.F.C. Correction publ. n° 110. *Science*, 1943, 98, 63.
112. HITCHENS A.P. et TINGLEY E.K. The selection of horses for the production of diphtheria antitoxin by an intrapalpebral test. *J. Immunol.*, 1917, 2, 395.
113. HOLT L.B. *Developments in diphtheria prophylaxis*. W. Heinemann Medical Books, London, 1950.
114. HOOKER S.B. et BOYD W.C. A formulation of the serological flocculation rate in the region of considerable antibody excess. *J. gen. Physiol.*, 1936, 19, 373.

115. HOOKER S.B. et BOYD W.C. The existence of antigenic determinants of diverse specificity in a single protein. III. Further notes on crystalline Hen- and Duck-ovalbumins. *J. Immunol.*, 1936, 30, 41.
116. HOTTLE G.A. et PAPPENHEIMER A.M. A quantitative study of scarlet fever toxin-antitoxin flocculation reaction. *J. exp. Med.*, 1941, 74, 545.
117. JACOBS J. On use of absorbents in immunization with haptens. *J. exp. Med.*, 1934, 59, 479.
118. JACOBY M. Ueber Ricin-Immunität. *Beitr. Chem. Physiol. Path.*, 1902, 1, 51.
119. JEFFERSON THOMSON K., FREUND J., SOMMER H.E. et WALTER A.W. Immunization of ducks against malaria by means of killed parasites with or without adjuvants. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1947, 27, 79.
120. JENSEN Cl. Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherie-Toxin und Antitoxin. *Acta path. microbiol. scand.*, 1933, suppl. XIV.
121. JERNE N.K. A study of avidity based on rabbit skin responses to diphtheria toxin-antitoxin mixtures. *Acta path. microbiol. scand.*, suppl. LXXXVII, 1951.
122. KABAT E.A. et MAYER M.M. *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill., 1948.
123. KAMINSKI M. Quelques observations sur la technique de précipitation spécifique en milieu gélifié d'Ouchterlony. I. Influence de la recharge en antigène. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1954, 36, 279.
124. KAMINSKI M. Quelques observations sur la technique de précipitation spécifique en milieu gélifié d'Ouchterlony. II. Etude du rôle des concentrations respectives en antigènes et en anticorps et du coefficient de diffusion de l'antigène dans le cas d'un mélange de deux systèmes précipitants. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1954, 36, 289.
125. KEKWICK R.A. et RECORD B.R. Some physical properties of diphtheria antitoxic horse sera. *Brit. J. exp. Path.*, 1941, 22, 29.
126. KEKWICK R.A. The constitution of some antitoxic horse sera. *Chemistry and Industry*, 1941, 60, 486.
127. KORNGOLD L. Immunological cross-reaction studied by the Ouchterlony gel diffusion technique. *J. Immunol.*, 1956, 77, 119.
128. KORNGOLD L. et LEEWEN G. (van). The effect of the antigen's molecular weight on the curvature of the precipitin line in the Ouchterlony technic. *J. Immunol.*, 1957, 78, 172.
129. KOWARSKI A. Ueber den Nachweis von pflanzlichem Eiweiss auf biologischem Wege. *Dtsch. med. Wschr.*, 1901, 27, 442.
130. KRAUS R. Ueber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus und PestbouillonKulturen, erzeugt durch homologes Serum. *Wien klin. Wschr.*, 1897, 10, 736.
131. KUNKEL H.G. et WARD S.M. The immunological determination of human albumin in biological fluids. *J. biol. Chem.*, 1950, 182, 597.
132. KUROKAWA M., MURATA R., NAKANO T., YAMADA T. et KUBOTA K. On the antigenicity of diphtheria toxoid. Part II. Preliminary report on immunizing potency of diphtheria toxoid fractions isolated at lower ammonium sulfate concentration. *Jap. J. med. Sci Biol.*, 1951, 4, 233.
133. LANDY M. et WEBSTER M.F. Studies on Vi antigen. III. Immunological properties of purified Vi antigen derived from *Escherichia coli* 5396/38. *J. Immunol.*, 1952, 69, 143.
134. LANDY M., TRAPANI R., FORMAL R.J. et KLUGLER I. Comparison of a hemagglutination procedure and the rabbit intradermal neutralization test for the assay of diphtheria antitoxin in human sera. *Amer. J. Hyg.*, 1955, 61, 143.
135. LAPRESLE Cl. Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. I. Conditions optimum d'activité et mode d'action des protéases de la rate du lapin. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1955, 37, 969.
136. LAPRESLE Cl. Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. II. Mise en évidence de trois groupements spécifiques différents dans

- le motif antigénique de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants dans le sérum de lapin anti-albumine humaine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 89, 654.
137. LAPRESLE Cl. et DURIEUX J. Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. IV. Variations individuelles de la réaction du sérum de lapin anti-albumine avec l'albumine dégradée. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1957, 39, 833.
138. LAPRESLE Cl. et DURIEUX J. Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. III. Modifications immunologiques de l'albumine en fonction du stade de dégradation. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 92, 62.
139. LAPRESLE Cl. et DURIEUX J. Etude de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. V. Antigénicité de l'albumine dégradée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 38.
140. LAWRENCE H.S. et PAPPENHEIMER A.M. Immunization of adults with diphtheria toxoid. I. Immunological properties of formalinized diphterial protein fractions from culture filtrates. *Amer. J. Hyg.*, 1948, 47, 226.
141. LEPOW I.H. et PILLEMER L. Studies on the purification of diphtherial toxin. *J. Immunol.*, 1952, 69, 1.
142. LEVINE L., WYMAN L. et EDSALL G. Chemical and immunochemical properties of diphtheria toxoid purified by ammonium sulfate fractionation. *J. Immunol.*, 1949, 63, 219.
143. LEVINE L. The antitoxic activity and gamma globulin distribution in fractionated diphtheria and tetanus antitoxin of equine origin. *Brit. J. exp. Path.*, 1952, 33, 190.
144. LINEWEAVER H. et MURRAY C.W. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *J. biol. Chem.*, 1947, 171, 565.
145. LINGGOOD F.V. Purification of diphtheria toxin and toxoid made from tryptic digest broths. *Brit. J. exp. Path.*, 1941, 22, 255.
146. LOCKE A. et MAIN E.R. The isolation of substances with immune properties. *J. infect.* 1926, 39, 484.
147. LOCKE A. et MAIN E.R. The nature of diphtheria toxin. *J. infect. Dis.*, 1928, 43, 41.
148. LOCKE A. et MAIN E.R. The relation of copper and iron to production of toxin and enzyme action. *J. infect. Dis.*, 1931, 48, 419.
149. LOEWENSTEIN E. Ueber aktive Schützimpfung bei Tetanus durch Toxoide. *Z. Hyg. InfekKr.*, 1909, 62, 491.
150. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Importance des produits de l'hydrolyse pepsique des panses de porc et de leur temps de digestion dans la production de la toxine diphtérique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1932, 109, 168.
151. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Variation du pouvoir antigène de la toxine diphtérique dans ses rapports avec le milieu de culture et le temps d'hydrolyse des panses de porcs. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1932, 109, 266.
152. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Variations du pouvoir antigène de la toxine diphtérique dans ses rapports avec la composition du milieu de culture. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1933, 112, 131.
153. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Technique d'hydrolyse pepsique des panses de porc. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1933, 112, 426.
154. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Etude des variations des composants du milieu de culture destiné à la production de la toxine diphtérique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1934, 116, 1214.
155. LOISEAU G. et PHILIPPE M. Production de la toxine diphtérique dans ses rapports avec le volume du milieu de culture. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1934, 117, 1056.
156. LONG D.A. Ascorbic acid and the production of antibody in the guinea-pig. *Brit. J. exp. Path.*, 1950, 31, 183.
157. LOWELL F.C. A comparison of the collodion particle technic with other methods of measuring antibody. *J. Immunol.*, 1943, 46, 177.

- 157^a. LUNDGREN H.P., PAPPENHEIMER A.M. et WILLIAMS J.W. The molecular weight of the diphtheria toxin protein. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1939, 61, 533.
158. McDUFFIE F.C. et KABAT E.A. A comparative study of methods used for analysis of specific precipitates in quantitative immunochemistry. *J. Immunol.*, 1956, 77, 193.
159. McSWEENEY C.J. Treatment of hypertoxic diphtheria with avid serum. *Lancet*, 1941, 1, 208.
160. MADSEN Th. et SCHMIDT S. Sur la dissociabilité du complexe toxine-antitoxine diphtériques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1929, 102, 1091.
161. MADSEN Th. et SCHMIDT S. Titration du sérum antidiphtérique sur cobaye (injection sous-cutanée) et sur lapin (injection intraveineuse). *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1929, 102, 1093.
162. MALKIEL S. et BOYD W.C. The composition of specific precipitates in the region of antigen excess. *J. exp. Med.*, 1937, 66, 383.
163. MARKHAM R. A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis. *Biochem. J.*, 1942, 36, 790.
164. MARRACK J. et SMITH E.C. The composition of diphtheria toxin-antitoxin floccules. *Proc. roy. Soc. B.*, 1930, 106, 1.
165. MARRACK J. et SMITH F.C. Quantitative aspects of immunity reactions: the precipitin reaction. *Brit. J. exp. Path.*, 1931, 12, 30.
166. MARRACK J. et SMITH F.C. Quantitative aspects in immunity reactions: the composition of the precipitate in precipitin reactions. *Brit. J. exp. Path.*, 1931, 12, 182.
167. MARRACK J. The chemistry of antigens and antibodies. *Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.)*, 1938, n° 230.
168. MARTIN L. Production de la toxine diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, 12, 26.
169. MASOUREDIS S.P., MELCHER L.R. et KOBlick D.C. Specificity of radioiodinated (I¹³¹) immune globulin as determined by quantitative precipitin reaction. *J. Immunol.*, 1951, 66, 297.
170. MEISSNER H. Die Beschälseuche. *Berl. Tierärztl. Wschr.*, 1909, 25, 634.
171. MILES A.A. Optimal proportions in agglutination with reference to the antigenic analysis of the Brucella group of organisms. *Brit. J. exp. Path.*, 1933, 14, 43.
172. MILES A.A. The antigenic surface of smooth *Brucella abortus* and *melitensis*. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, 20, 63.
173. MITCHISON D.A. et SPICER C.C. A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. *J. gen. Microbiol.*, 1949, 3, 184.
174. MODERN F. et WERNICKE R. Contribution à l'étude du précipité toxine-antitoxine diphtériques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1930, 105, 119.
175. MOORE S. et STEIN W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of aminoacids. *J. biol. Chem.*, 1948, 176, 367.
176. MORCH J.R. Ueber gereinigtes und konzentriertes Serum gegen Diphtherie. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1932, 123, 297.
177. MORTON H.E. et GONZALEZ L.M. On the site of formation of diphtherial toxin. *J. Immunol.*, 1942, 45, 63.
178. MUELLER J.H. Studies on cultural requirements of bacteria. VI. The diphtheria bacillus. *J. Bact.*, 1935, 30, 513.
179. MUELLER J.H. A simplified formula for diphtheric toxin broth. *J. Immunol.*, 1939, 37, 103.
180. MUELLER J.H. et MILLER P.A. Production of diphtheric toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J. Immunol.*, 1941, 40, 21.
181. MUELLER J.H. et JOHNSON E.R. Acid hydrolysates of casein to replace peptone in the preparation of bacteriological media. *J. Immunol.*, 1941, 40, 33.
182. MUETHER R. et MACDONALD W.C. Precipitin test for tuberculin antibodies. *J. Lab. Clin. Med.*, 1945, 30, 411.

183. MURATA R., KUROKAWA M., NAKANO T., YOKOTA M. et KUBOTA K. On the antigenicity of diphtheria toxoid. Part III. The immunizing potency of diphtheria toxoid fractions isolated at lower ammonium sulfate concentration. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 1952, 5, 239.
184. MYERS W. On immunity against proteids. *Lancet*, 1900, 2, 98.
185. MYERS W. Ueber Immunität gegen Proteide. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1900, 28, 237.
186. NICOLLE Ch. Recherches sur la substance agglutinée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, 12, 161.
187. NIGGEMEYER H. Der Nachweis bisher unbekannter Gifte des *Corynebacterium diphtheriae* ihre Bedeutung für das klinische Bild der Erkrankung sowie die antitoxische Therapie und Impfprophylaxe. *Ann. Paediatrici*, 1955, 185, 1.
188. NORLIN G. Purification of diphtheria toxin and diphtheria toxoid. *Acta path. microbiol. scand.*, 1947, 24, 505.
189. NORLIN G. Studies on the purification of diphtheria toxin. *Brit. J. exp. Path.*, 1955, 36, 599.
190. NORRIS C. The bacterial precipitins. *J. infect. Dis.*, 1904, 1, 463.
191. NORTHROP J.H. Purification and crystallization of diphtheria antitoxin. *J. gen. Physiol.*, 1942, 25, 465.
192. NORTHROP J.H. *Crystalline enzymes*, Columbia University Press, New York, 1948, p. 286.
193. NUNGESTER W.J. et LEWIS S.R. Application of «falling drop» measurement of density to quantitative determination of antibody in immunological reactions. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1941, 48, 425.
194. OAKLEY C.L. et FULTHORPE A.J. Antigenic analysis by diffusion. *J. Path. Bact.*, 1953, 65, 49.
195. O. MEARA R.A.Q. *C. diphtheriae* and the composition of its toxin in relation to the severity of diphtheria. *J. Path. Bact.*, 1940, 51, 317.
196. OUCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels. II. Factors determining the site of the precipitate. *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 1949. *Band 1*, n° 7, 43.
197. OUCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels. III. The time factor. *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 1949. *Band 1*, n° 9, 55.
198. OUCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels. *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 1949. *Band 26 B*, n° 14, 1.
199. OUCHTERLONY O., ERICSSON H. et NEUMULLER C. Immunological analysis of diphtheria antigens by the gel diffusion method. *Acta med. scand.*, 1950, 138, 76.
200. OUCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, 22, 231.
201. OUDIN J. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. *Methods in Medical Research*, The Year Book Publ., Chicago, 1952, vol. 5, p. 335.
202. PAPPENHEIMER A.M. et JOHNSON S.J. Studies in diphtheria toxin production I: The effect of iron and copper. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, 17, 335.
203. PAPPENHEIMER A.M. Studies in diphtheria toxin production. II. Production of potent diphtheria toxin on a simple amino-acid medium. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, 17, 342.
204. PAPPENHEIMER A.M. et JOHNSON S.J. Studies in diphtheria toxin production. III. A simple gelatin hydrolysate medium and some properties of the toxin produced thereon. *Brit. J. exp. Path.*, 1937, 18, 239.
205. PAPPENHEIMER A.M. et ROBINSON E.S. A quantitative study of the Ramon diphtheria flocculation reaction. *J. Immunol.*, 1937, 32, 291.
206. PAPPENHEIMER A.M. Diphtheria toxin. I. Isolation and characterization of a toxic protein from *Corynebacterium diphtheriae* filtrates. *J. biol. Chem.*, 1937, 120, 543.
207. PAPPENHEIMER A.M., MUELLER J.H. et COHEN S. Production of potent diphtherial toxin on a medium of chemically defined composition. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*. 1937, 36, 795.

208. PAPPENHEIMER A.M. Anti-egg albumin antibody in the horse. *J. exp. Med.*, 1940, 71, 263.
209. PAPPENHEIMER A.M. Studies on diphtheria toxin and its reaction with antitoxin. *J. Bact.*, 1942, 43, 273.
210. PAPPENHEIMER A.M. Diphtheria toxin. III. A reinvestigation of the effect of iron on toxin and porphyrin production. *J. biol. Chem.*, 1947, 167, 251.
211. PAPPENHEIMER A.M. et HENDÉE E.D. Diphtheria toxin. IV. The iron enzymes of *Corynebacterium diphtheriae* and their possible relation to diphtheria toxin. *J. biol. Chem.*, 1947, 171, 701.
212. PAPPENHEIMER A.M. et LAWRENCE H.S. Immunization of adults with diphtheria toxoid. II. An analysis of the pseudo-reactions to the Schick test. *Amer. J. Hyg.*, 1948, 47, 233.
213. PAPPENHEIMER A.M. et LAWRENCE H.S. Immunization of adults with diphtheria toxoid. III. Highly purified toxoid as an immunizing agent. *Amer. J. Hyg.*, 1948, 47, 241.
214. PAPPENHEIMER A.M. et YONEDA M. A reinvestigation of the diphtheria toxin-antitoxin flocculation reaction using ³⁵S-methionine labelled toxin. *Brit. J. exp. Path.*, 1957, 38, 194.
215. PARK W.H. Active immunization in diphtheria by toxin-antitoxin mixture. *Amer. J. Obstet and Disear. Women Childr.*, 1913, 68, 1213.
216. PARK W.H. Toxin-antitoxin immunization against diphtheria. *J. Amer. med. Ass.*, 1922, 79, 1584.
217. PETERMANN M.L. et PAPPENHEIMER A.M. The ultracentrifugal analysis of diphtheria proteins. *J. phys. Chem.*, 1941, 45, 1.
218. PETERMANN M.L. Ultracentrifugal analysis of pepsin-treated serum globulins. *J. phys. Chem.*, 1942, 46, 183.
219. PETERMANN M.L. The action of papain on beef serum pseudoglobulin and diphtheria antitoxin. *J. biol. Chem.*, 1942, 144, 607.
220. PILLEMER L. et ROBBINS K.C. Chemistry of toxins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1949, 3, 265.
221. POPE C.G. et LLEWELLYN SMITH M. The routine preparation of diphtheria toxin of high value. *J. Path. Bact.*, 1932, 35, 573.
222. POPE C.G. The production of toxin by *C. diphtheriae*. II. Effect produced by additions of iron and copper to the medium. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, 218.
223. POPE C.G. et HEALEY M. A photo-electric study of reactions between diphtheria toxin and antitoxin. *Brit. J. exp. Path.*, 1938, 19, 397.
224. POPE C.G. et HEALEY M. The preparation of diphtheria antitoxin in a state of high purity. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, 20, 213.
225. POPE C.G. et LINGGOOD F.V. Purification of diphtheria toxoid. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, 20, 297.
226. POPE C.G., STEVENS M.F., CASPARY E.A. et FENTON E.L. Some new observations on diphtheria toxin and antitoxin. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, 32, 246.
227. POPE C.G. et STEVENS M.F. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera III. Further studies on enzyme systems which split the antitoxin molecule. *Brit. J. exp. Path.*, 1951, 32, 314.
228. POPE C.G. et STEVENS M.F. Isolation of a crystalline protein from highly purified diphtheria toxin. *Lancet*, 1953, 2, 1190.
229. POPE C.G. et STEVENS M.F. The purification of antitoxin by absorption of non-antitoxic antibodies. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, 34, 56.
230. POPE C.G. et STEVENS M.F. The preparation of non-flocculating diphtheria antitoxin by absorption of non-antitoxic antibodies. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, 34, 241.
231. POPE C.G. Diphtheria toxin and antitoxin. A short review of progress since the work of Ehrlich. *Int. Arch. Allergy*, 1954, 5, 115.
232. POPE C.G. The diphtheria antigen-antibody flocculation system. *Disc. Faraday Soc.*, 1954, 18, 323.

233. POPE C.G. Observations on the diphtheria toxin-antitoxin reaction. *Brit. J. exp. Path.*, 1957, 38, 207.
- 233^a. POPE C.G. et STEVENS M.F. The purification of diphtheria toxin and the isolation of crystalline toxin-protein. *Brit. J. exp. Path.* 1958, 39, 139.
234. PORTER R.R. The isolation and properties of a fragment of bovine serum-albumin which retains the ability to combine with rabbit anti-serum. *Biochem. J.*, 1957, 66, 677.
235. PRESSMAN D. Determination of microquantities of certain proteins. *Ind. Eng. & Chem., Anal. Ed.*, 1943, 15, 357.
236. PRIGGE R. Ueber den Toxongehalt des Diphtheriegiftes. *Z. ImmunForsch.*, 1934, 34, 81.
237. QUIGLEY J.J. A simple technic for ultrafiltration. *Amer. J. Hyg.*, 1934, 20, 218.
238. RAMON G. Flocculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtériques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1922, 86, 661.
239. RAMON G. Sur une technique de titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1922, 86, 711.
240. RAMON G. A propos du titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique par la flocculation. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1922, 86, 813.
241. RAMON G. Sur la concentration du sérum antidiphtérique et l'isolement de l'antitoxine. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1923, 88, 167.
242. RAMON G. Pouvoir flocculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1923, 89, 2.
243. RAMON G. Sur le pouvoir flocculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1923, 177, 1338.
244. RAMON G. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtériques. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, 38, 1.
245. RAMON G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphtérique. *Bull. Soc. Centrale Med. Vet.*, 1925, 78, 227.
246. RAMON G. Sur la production de l'antitoxine diphtérique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1925, 93, 506.
247. RAMON G. Essais sur l'immunité antitoxique. De l'aptitude des animaux à la production des antitoxines. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1929, 100, 485.
248. RAMON G., NÉLIS P. et BONNET H. Sur la flocculation dans les mélanges de toxine staphylococcique et de sérum spécifique; son aspect, ses caractéristiques, sa signification. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1935, 119, 787.
249. RAMON G., BONNET H., NÉLIS P., RICHOU R. et THIEFFRY S. Sur une méthode d'évaluation du pouvoir antigène de la toxine staphylococcique par la flocculation spécifique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1935, 119, 790.
250. RAMON G. et RICHOU R. Sur le dosage de la toxine staphylococcique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1936, 121, 379.
251. RAMON G. La flocculation dans les mélanges de bouillon tétanique et de sérum spécifique et la mesure de la valeur antigène de la toxine et de l'anatoxine tétaniques. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1938, 129, 539.
252. RAMON G. La méthode de flocculation et le dosage des toxines et anatoxines des bacilles diphtérique et tétanique et de certains germes anaérobies de la gangrène gazeuse (*Perfringens*, *vibrio septique*, *Oedématis*, *Histolytique*). *Rev. Immunol. (Paris)*, 1940, 6, 65.
253. RAMON G. et BOIVIN A. Le dosage par la méthode de flocculation, de l'antigène glucido-lipidique et de l'anticorps correspondant. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1941, 135, 230.
254. RAMSHORST J.D. (van). *De berelding van diphtherie-entstoffen*. Thèse, Université d'Utrecht, 1951.
255. RAYNAUD M., TURPIN A., MANGALO R. et BIZZINI B. Croissance et toxinogénèse. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 87, 599.

256. RELYVELD E.H., TURPIN A., LAFFAILLE A., PARIS C. et RAYNAUD M. Purification de la toxine diphtérique. Contrôle qualitatif des fractions par la méthode de précipitation spécifique en gel. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 87, 301.
257. ROSS V. A method for purifying diphtheria toxoid and combining it with protamine. *J. Immunol.*, 1949, 63, 183.
258. ROTHEN A. Purified diphtheria antitoxin in the ultracentrifuge and in the electrophoresis apparatus. *J. gen. Physiol.*, 1942, 25, 487.
259. ROUX E. et MARTIN L. Contribution à l'étude de la diphtérie (sérum-thérapie). *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, 8, 609.
260. RUBINSTEIN S., SOSIMA S.M. et RAKHMANCHICK G.I. Purification and concentration of diphtherial toxins and anatoxins. *Z. Microbiol. Epidemiol. Immunitätsforsch (U.R.S.S.)*, 1941, n° 1, 18-26, cit. *Chem. Abstr.*, 1942, 36, 1381.
261. SALK J.E. Partial purification of the virus of epidemic influenza by adsorption on calcium phosphate. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1941, 46, 709.
262. SALK J.E. The immunising effect of calcium phosphate adsorbed influenza virus. *Science*, 1945, 101, 122.
263. SALKOWSKY E. Ueber die Wirkung der Antiseptica auf Toxine. *Klin. Wschr.*, 1898, 35, 545.
264. SANDOR G. Dissociation par digestion protéolytique du flocculat spécifique obtenu dans les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques. Obtention d'antitoxine diphtérique d'un degré de pureté très élevé. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1939, 130, 1187.
265. SANDOR G. Dissociation du flocculat diphtérique spécifique. Teneur en « protéides précipitables » de différentes préparations antitoxiques. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1942, 24, 1174.
266. SCHEER J. (van der) et WYCKOFF R.W.G. An electrophoretic study of tetanus antitoxin sera. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1940, 43, 427.
267. SCHEER J. (van der) et WYCKOFF R.W.C. Electrophoretic analysis of digested antitoxic sera. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1940, 45, 634.
268. SCHEER J. (van der), WYCKOFF R.W.G. et CLARKE F.H. The electrophoretic analysis of tetanal antitoxic horse sera. *J. Immunol.*, 1941, 40, 173.
269. SCHEER J. (van der), WYCKOFF R.W.G. et CLARKE F.H. An electrophoretic examination of digested sera. *J. Immunol.*, 1941, 41, 349.
270. SCHEFF G. et SCHEFF I.P. Mechanism of the production of diphtheria toxin. The role of sulfur compounds and of copper and iron. *J. infect. Dis.*, 1934, 54, 221.
271. SCHEIBEL I.F. Experimental studies on active immunization with combined diphtheria-tetanus vaccine. *Acta path. microbiol. scand.*, 1944, 21, 130.
272. SCHEIBEL I.F. et TILINIUS S. Immunization of adults against diphtheria. *Acta path. microbiol. scand.*, 1950, 27, 69.
273. SCHEIBEL I.F. A comparative study on intracutaneous and haemagglutination procedures for assaying diphtheria antitoxin with special reference to the avidity of the antitoxin. *Acta path. microbiol. scand.*, 1956, 39, 455.
274. SCHEIDEGGER J.J. L'analyse immuno-électrophorétique des liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)*, 1957, 39, suppl. n° 1, 45.
275. SCHICK B. Kutanreaktion bei Impfung mit Diphtherietoxin. *Münch. med. Wschr.*, 1908, 55, 504.
276. SCHMIDT S., HANSEN A. et KJAER K.A. Purification et concentration de la toxine et de l'anatoxine diphtériques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, 46, 202.
277. SCHMIDT S. et HANSEN A. Immunisation active du cobaye contre la fièvre aphteuse au moyen du virus actif combiné avec l'hydroxyde d'aluminium. *Acta path. microbiol. scand.*, 1936, 13, 405.
278. SIERAKOWSKI S. et ZAJDEL R. Sur la purification des toxines diphtériques par ultra-filtration et précipitation au moyen d'un acide à un pH convenable. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1929, 102, 107.

279. SMITH T.H. The degree and duration of passive immunity to diphtheria toxin transmitted by immunized female guinea-pigs to their immediate offspring. *J. med. Res.*, 1907, 16, 359.
280. SMITH T.H. Active immunity produced by so-called balanced or neutral mixtures of diphtheria toxin and antitoxin. *J. exp. Med.*, 1909, 11, 241.
281. SMITH W. The titration of antipneumococcus serum. *J. Path. Bact.*, 1932, 35, 509.
282. SORDELLI. Préparation rapide des sérums antidiphthériques de haute valeur. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 1921, 85, 314.
283. STAVITSKY A.B. Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 1954, 72, 360.
284. STRØM A. *The production of diphtheria toxin*. A.S. Haakensen & Co., Oslo, 1935.
285. TASMAN A. et BRANDWIJK A.C. Reiniging en concentratie van Diphtherietoxine en -anatoxine VI. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 1934, 1, 1.
286. TASMAN A. et WAASBERGEN J.P. (van). Reinigung von Diphtherietoxin und Anatoxin. III. Vergleichende Reinigungen durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd-Suspension und Fällung mit Aluminiumsulfat. *Z. ImmunForsch.*, 1932, 75, 164.
287. TAYLOR G.L. The result of some quantitative experiments on the serum precipitation reactions. *J. Hyg. (Lond.)*, 1931, 31, 56.
288. TAYLOR G.L. The dissimilarity of the results of precipitin titrations performed with a constant amount of antiserum and with a constant amount of antigen. *J. Hyg. (Lond.)*, 1933, 33, 12.
289. TAYLOR G.L., ADAIR C.S. et ADAIR M.E. The precipitation reaction. Optimal proportions, neutrality and maximal precipitation in mixtures of albumin and antiserum. *J. Hyg. (Lond.)*, 1934, 34, 118.
290. TCHISTOVITCH Th. Etudes sur l'immunisation contre le sérum d'anguilles. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, 13, 406.
291. TIMMERMAN W.A. Etude comparative de la réaction de floculation de Ramon effectuée avec une quantité d'antigène constante ou avec une quantité d'antisérum constante. *Ann. Inst. Pasteur*, 1934, 52, 146.
292. TISELIUS A. et KABAT E.A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. exp. Med.*, 1939, 69, 119.
293. TISELIUS A. Chromatography of proteins on calcium phosphate columns. *Ark. Kemi (Stockholm)*, 1955, 7, 443.
294. UHLENHUTH. Demonstration eines Dotterantisérums. *Dtsch. med. Wschr.*, 1903, 29, 39 v.
295. URIEL J. et GRABAR P. Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 427.
296. WADSWORTH A. et WHEELER M.W. The attenuation and toxin production of the diphtheria bacillus. *J. infect. Dis.*, 1928, 42, 179.
297. WADSWORTH A. et QUIGLEY J.J. Studies on the purification of diphtheria toxin by ultrafiltration. *Amer. J. Hyg.*, 1934, 20, 225.
298. WADSWORTH A., WHEELER M.W. et MENDEZ L. The attenuation and toxin production of the diphtheria bacillus. IV. Ultrafiltration of the toxin produced in peptone-dialysate mediums. *J. infect. Dis.*, 1938, 62, 129.
299. WADSWORTH A. et WHEELER M.W. The attenuation and toxin production of the diphtheria bacillus. VII. Studies on the separation and analysis of products of synthesis in diphtheria culture filtrates. *J. infect. Dis.*, 1943, 73, 95.
300. WALPOLE G.S. Notes on collodion membranes for ultrafiltration and pressure dialysis. *Biochem. J.*, 1915, 9, 284.
301. WEICHSELBAUM T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Technical Section*, 1946, 10, 40.

302. WEIR J.M. Technic for demonstrating antibodies against tuberculin in experimental animals with sensitized collodion pellets. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1941, 46, 47.
303. WILLIAMS C.A. Immunochemical studies on antidiphtherial horse serum by a new analytical method. 6^e Congrès International de Microbiologie, Rome, sept. 1953, vol. 2, p. 145.
304. WILLIAMS C.A. *Immuno-electrophoresis: A new method for the analysis of complex antigen and antibody mixtures. Application to human serum antigens and hyper-immune horse serum*. Thesis, Rutgers University, 1954.
305. WILLIAMS C.A. et GRABAR P. Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum. *J. Immunol.*, 1955, 74, 158.
306. WILSON M.W. et PRINGLE B.H. Cross-reactions in the Ouchterlony plate: analysis of native and halogenated bovine serum albumins. *J. Immunol.*, 1956, 77, 324.
307. WU H., CHENG L.H. et LI C.P. Composition of antigen-precipitin precipitate. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1927-28, 25, 853.
308. WU H., SAH P.P.T., et LI C.P. Composition of antigen-precipitin precipitate. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1929, 26, 737.
309. WUNDERLY Ch. et HÄSSIG A. Spektralphotometrische Analyse der Antigen/Antikörper Reaktion. *Helv. chim. Acta*, 1949, 32, 1554.
310. YEU F. et PAVAGEAU D. Antitoxine diphtérique purifiée à partir du complexe antigène-anticorps. I. Préparation. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 240.
311. YONEDA M. Studies on the toxicity of diphtheria toxin. I. Toxicity of the diphtheria toxin produced in a synthetic medium. *Nagoya J. med. Sci.*, 1951, 14, 69.
312. YONEDA M. Low toxicity of the diphtherial culture filtrate and its relation to the absence of tyrosin. *Nature (Lond.)*, 1951, 168, 879.
313. YONEDA M. et PAPPENHEIMER A.M. Some effects of iron deficiency on the extracellular products released by toxigenic and nontoxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bact.*, 1957, 74, 256.
314. YOUNG G.F. et COLWELL C.A. Constant antiserum optimal ratios obtained with rat precipitin. *J. infect. Dis.*, 1940, 67, 48.

TABLE DES MATIÈRES

[illegible]

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

« Electrophorèse des protéines sur colonne ».

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 6 juin 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.

Editions scientifiques Hermann
Numéro d'édition 2049
Dépôt légal numéro 494, 3^{me} trimestre 1959

Imprimerie Louis-Jean. Gap. France

